

Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2013 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.instand-ev.de>) eingesehen werden. Obwohl die bevorzugte Sprache dieser Dokumente deutsch ist, streben wir an, zumindest eine kurze Diskussion der Ergebnisse sowie die wichtigsten wissenschaftlichen Aspekte in Englisch bereitzustellen und die Tabellen zweisprachig zu gestalten.

Udo Reischl¹
Eberhard Straube²
Matthias Maaß³
Enno Jacobs⁴
Wulf Schneider¹
Volker Fingerle⁵
Ulrich Busch⁵
Dimitrios Frangoulidis⁶
Wolf Splettstösser⁶
Gregor Grass⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷

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

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

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

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

5 Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim, Deutschland

6 Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr, München, Deutschland

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 15 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 Verdünnungsreihe an *Borrelia garinii* OspA Typ 3 versandt und die Probe mit der geringsten Menge an Zielorganismen (10^3 Borrelien/mL) wurde nur noch von ca. 2/3 aller Teilnehmer erfolgreich detektiert. Als weiteres „Highlight“ innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539** ein sog. **lifestock-associated (LA) MRSA Isolat** (Oxacillin-resistenter *Staphylococcus aureus*, charakteristischerweise MLST Typ 398 und mit einem aus molekularbiologischer Sicht „unexotischen“ SCCmec Kassettyp) ausgesandt, das aber von nahezu allen PCR-/NAT-Testsystemen der Ringversuchsteilnehmer problemlos als MRSA identifiziert werden konnte.

Angesichts der beiden Milzbrandfälle bei Heroinkonsumenten aus dem Raum Regensburg, die wir in unserem Institut, sozusagen „unmittelbar vor Ort“, sowohl kulturell isoliert, mittels real-time PCR identifiziert und in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) und dem RKI (Berlin) auch molekular feintypisieren konnten, wird der Ringversuch **RV 542** (Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii*) zukünftig um den Zielorganismus *Bacillus anthracis* erweitert. Er ist bereits im Ringversuchsprogramm als kombinierter PCR/NAT-Ringversuch „**RV 542** Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii*/**B. anthracis**“ gelistet. Aufgrund des großen Interesses an geeigneten PCR-Protokollen und der Verfügbarkeit von entsprechendem Positivkontrollmaterial haben wir uns entschlossen, diesen kombinierten Ringversuch RV 542 als speziellen Service für die im L3-Bereich tätigen Kolleginnen und Kollegen ohne Mehrkosten im Vergleich zu dem vormaligen *C. burnetii* Ringversuch anzubieten. Bei der fachlichen Betreuung werden wir hier dankenswerterweise durch Herrn Kollegen PD Dr. Gregor Grass vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) unterstützt. Der **RV 560** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA wird ebenfalls ab sofort in das reguläre Ringversuchsprogramm „Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT“ von INSTAND e.V. aufgenommen. An der Ringversuchsleitung wird meine Kollegin Frau Dr. Ingrid Reiter-Owona vom Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP) in Bonn maßgeblich beteiligt sein.

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

Untersuchungsergebnisse Mai 2013

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 # 1315303), sowie die positive Probe des RV 531 # 1315314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1315301), *Bordetella pertussis* (Probe # 1315323), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 1315354), MRSA/cMRSA (Probe # 1315393), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1315404), *Coxiella burnetii* (Probe # 1315421), sowie *Bacillus anthracis* (Probe # 1315421). 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. Tab. 1 zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tab. 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in Tab. 3 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 neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (<http://www.instand-ev.de>) als pdf-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion 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 zwei Proben mit relativ geringen Menge an *C. trachomatis* (# 1315301, $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL und # 1315303, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL), eine Probe (# 1315301) mit ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae* und zwei Proben mit relativ hoher Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen (# 1315302 und # 1315304, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL).

Auch wenn die beiden positiven Proben # 1315301 und # 1315303 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis* Zielorga-

nismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 170 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 7 falsch-negative Ergebnisse. Da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchwegs 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 Probe 1315301 (*C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae*; ca. 5×10^3 IFU bzw. ca. 1×10^3 CFU/mL) diesmal von 25 der insgesamt 170 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA mitgeteilt. In den anderen beiden GO-positiven Proben (# 1315302 und # 1315304) befand sich mit 1×10^4 CFU/mL zwar nur eine geringfügig höhere Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen – hier konnten jedoch (interessanterweise) nur 4 der insgesamt 170 Teilnehmer keine Gonokokken DNA nachweisen und es wurden lediglich 8 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Für diesen Effekt, der in ähnlicher Konstellation ja bereits im vorhergehenden Ringversuch vom November 2012 beobachtet wurde, hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Denkbar wäre natürlich eine gewisse Konkurrenzsituation der im Reaktionsgemisch der proprietären Testkits vorhandenen Primer-Moleküle. Zumindest aus wissenschaftlicher Sicht ist bei Chlamydien und Gonokokken aber davon auszugehen, dass die spezifische Amplifikation von Genomsegmenten dieser beiden unterschiedlichen Zielorganismen über unterschiedliche Primersets verläuft und seitens der Hersteller dafür keine Konsensus-Primersequenzen eingesetzt werden.

Angesichts der mit 1×10^3 CFU/mL ehrlicherweise nicht als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in der Probe # 1315301 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen Gonokokken-spezifischen NAT-gestützten Testsystems 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 zumindest die *C. trachomatis* Zielorganismen von allen 9 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe Testsystemen erfolgreich nachgewiesen. Selbst der erfolgreiche Nachweis von Gonokokken RNA Zielsequenzen in den Proben # 1315302 und # 1315304 mit ca. 10^4 CFU/mL gelang allen 9 Teilnehmern. Dies deutet, zumindest indirekt, auf ausreichend hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin.

Auffällig war jedoch die Ergebnislage unter den GenProbe Usern bei der Probe # 1315301 (ca. 5×10^3 IFU/mL an *C. trachomatis* und ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*): hier konnte lediglich einer der insgesamt 9 Anwender des konfektionierten und standardisierten GenProbe CT/NT Testsystems die Gonokokken RNA erfolgreich nachweisen. Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 170 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 detaillierter Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-

spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden diesmal zusätzlich Tab. 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 2 und 3) angefertigt. In Tab. 4 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in Tab. 5 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.

Dies gilt im aktuellen Ringversuch vor allem für die 2 (!) Teilnehmer mit dem Cepheid Xpert CT/NG Testsystem. Von einem Teilnehmer wurde hier ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt und die Richtigkeitsquote sinkt dadurch von 100 auf 88%.

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

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

RV 531: Chlamydia trachomatis

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal zwei Proben mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1315314 und # 1315312, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL und $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL an *C. trachomatis*), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1315311 und # 1315313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tab. 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist (siehe Anhang 1, S. 4), wurden bei den beiden positiven Proben durchwegs korrekte Ergebnisse für Probe # 1315312 und lediglich von 2 der insgesamt 115 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Probe # 1315314 mitgeteilt. Auch bei den *C. trachomatis* negativen Proben # 1315311 und # 1315313 wurden diesmal (bis auf 3 isoliert falsch-positive und 3 als „fraglich“ klassifizierte Ergebnisse) erfreulicherweise nahezu durchwegs richtig negative Ergebnisse berichtet.

Dies 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 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 der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

Inhibitionskontrollen wurden von 113 der 115 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsergebnisse wurden diesmal bei 2 der insgesamt 460 Einzel-Testergebnisse beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, dass wir auch im aktuellen Ringversuch keine der Einzelproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in-house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchwegs auf hohem Niveau mit geringer statistischer Streuung.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: BD ProbeTec (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (2x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), HAIN Lifescience FluoroType CT (2x), APTIMA Combo 2 Assay von Fa. Gen Probe (1x), VERSANT CT/GC DNA Assay von Siemens (1x), InterLab-Service AmpliSens CT (1x), Onar CT von Minerva biolabs (1x) und Sacace *Chlamydia trachomatis* Real-TM (1x).

RV 532: Bordetella pertussis

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei positive Proben mit einer hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 1315322 mit 10^5 CFU/mL und # 1315323 mit 10^3 CFU/mL an *B. per-*

tussis), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1315321 und # 1315324) die lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von Bordetella pertussis DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben. Lediglich von einem der insgesamt 145 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1315321 mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Da diese Probe lediglich *E. coli* Zellen enthielt ist eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich.

Unter den insgesamt 580 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 6 falsch-negative klassifizierte Ergebnisse für die schwach positive Probe # 1315323 (10^3 CFU/mL an *B. pertussis*).

Inhibitionskontrollen wurden von 142 der insgesamt 145 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

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 µl) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. In der mikrobiologischen Praxis sind vor allem bei Rachenabstrichen gelegentlich auch geringe Erregermengen zu erwarten – daher sollten falsch-negative Ergebnisse bei den betroffenen Teilnehmern durchaus Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in-house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 71 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 12 Teilnehmern die Verwendung des Pertussis Toxin Gens und von 3 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gensegments als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (7x), GeneProof *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit (6x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), TIB Molbiol LightMix BP (3x), HAIN Lifescience GenoQuick Bordetella (3x), Mikrogen Diagenode *B. pertussis/B. parapertussis* kit (2x), *B. pertussis /B. parapertussis* von Cepheid (2x), RIDA GENE Bordetella Real Time PCR (2x), BactoReal *B. pertussis* von Ingenetix (1x), SIMPLEXA Bordetella Universal Direct Assay (1x), Seegene Seeplex Pneumobacter ACE Detection (1x), ARGENE Bordetella R-gene (1x), Vircell

Speed-oligo Bordetella (1x), Bordetella Real-TM von Sacace (1x) und Attomol Bordetella DNA-LINA (2x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tab. 1 dargestellt (siehe Anhang 1, S. 6), enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine positive Probe eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1315333; 1×10^4 CFU/ml) und eine positive Probe eines Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* (# 1315331; 1×10^6 CFU/ml). Probe # 1315334 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Campylobacter jejuni* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), und Probe # 1315332 ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analyzesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in einer der beiden positiven Proben (# 1315331 mit $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml) führte beim Nachweis von *H. pylori* DNA erfreulicherweise wieder einmal zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten.

Lediglich von einem der insgesamt 48 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1315332 mitgeteilt. Diese Probe enthielt lediglich eine Kultursuspension von *E. coli* und eine Kreuzreaktion aufgrund mangelnder Spezifität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems erscheint bei dieser Konstellation sehr unwahrscheinlich.

Bei der Probe # 1315334, die diesmal eine Kultursuspension von *Campylobacter jejuni* in nennenswerter Menge enthielt, wurden von allen 48 Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse berichtet. Dies deutet auf eine gute analytische Spezifität der eingesetzten PCR Testsysteme hin. Sowohl die kommerziellen als auch die eigenentwickelten Testsysteme schnitten im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab.

Bis auf 9 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ 4x Genotype Helico Kit von HAIN Lifescience, 1x Geno Sen's *Helicobacter pylori* von Genome Diagnostics, 1x Diarella *Helicobacter real time* PCR Kit von Gerbion und 1x *H. pylori* Real TM von Sacace angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. in-house Testsysteme. Inhibitionskontrollen wurden von 47 der insgesamt 48 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

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 32 der insgesamt 48 Teilnehmer mitge-

teilt, und bei 27 Laboratorien waren die mitgeteilten Ergebnisse der molekularen Resistenztestung auch 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-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen). Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher zwei unterschiedliche aber relativ stark EHEC positive Proben mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1315344: *E. coli*, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- und O157-positiv), und mit ca. 1×10^4 CFU/mL (# 1315343: *E. coli*, *stx*_{2c}- und EAEC-positiv), sowie eine Probe # 1315342 mit einem *E. coli* K12 Stamm (*eae*-, *hlyA*-negativ). Probe # 1315341 enthielt diesmal ca. 1×10^4 CFU/mL *Salmonella enterica* Serovar Typhi.

Die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC führte hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten – sowohl für positive als auch für negative Befunde. Von 103 der insgesamt 110 Teilnehmer wurden jedoch durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet.

Probe # 1315343 enthielt diesmal ein „überaus interessantes“ *stx*_{2c}-positives EHEC Patientenisolat, das neben dem Shiga-Toxin Gen auch entsprechende genetische Marker für Enteroaggregative *E. coli* (EAEC) enthält. Auch wenn diese pathogenetische Konstellation wohl eher als ungewöhnlich zu betrachten ist, soll hier an einem Beispiel aus der mikrobiologischen PCR-Routinediagnostik wieder einmal die überraschende Vielfalt an möglichen Genkonstellationen im Umfeld von EHEC-Isolaten aufgezeigt werden.

Für die 5 falsch-negativen PCR-Resultate bei dem *stx*-2c positiven EHEC Isolat (# 1315343) sowie den 3 falsch-negativen PCR-Befunden bei dem *stx*-1 und *stx*-2 positiven EHEC Isolat (# 1315344) gibt es keine naheliegenden Erklärungen – eventuell decken die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an „üblichen“ *stx*-1 und *stx*-2 Genen ab. Aus wissenschaftlicher Sicht hätte man bei manchen PCR-Testsystemen allenfalls für *stx*-2f eine „diagnostische Lücke“ erwarten können, da dessen Gensequenz bekanntermaßen relativ wenig Homologie zu den übrigen Shiga-Toxin Gensequenzen aufweist. Aber ein *stx*-2f positives EHEC Isolat war diesmal ja nicht dabei...

Die Probe # 1315341 mit nennenswerten Mengen an *Salmonella enterica* Serovar Typhi führte erfreulicherweise bei keinem der 110 Teilnehmer zu falsch-positiven Ergebnissen.

Interessanterweise waren von den falsch-negativen EHEC Ergebnissen bei den Proben # 1315343 und # 1315344 diesmal vorwiegend Anwender mit kommerziellen Testsystemen betroffen. Da jedoch bei genauerer Betrachtung der Ergebnislage von der überwiegenden Mehrzahl der Anwender solch vorkonfektionierter und standardisierter kommerzieller PCR-Kits richtige Befunde berichtet wurden, sollten entsprechende Defizite in Einzelfällen nicht so sehr bei den Konzepten oder dem Design der PCR-Testsysteme selbst, sondern vermutlich eher auf Seiten der betroffenen Anwender gesucht werden.

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

Neben der stark ansteigenden Zahl an „Hain Lifescience GenoType EHEC“- und „r-biopharm RIDAGENE EHEC“-Anwendern gab die Mehrzahl der Teilnehmer nach wie vor die Verwendung von selbstentwickelten oder „anderen“ kommerziellen Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Zudem wurden von 99 der insgesamt 110 Teilnehmer die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolsin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, größtenteils korrekt.

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 (1x), r-biopharm RIDA GENE EHEC/EPEC (1x), Surefood pathogen STEC screening plus von Congen (1x) und LightMix Kit von TIB Molbiol (1x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu lato Genotypen bzw. auch OspA-Typen, die in Europa und Asien mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden, nach wie vor ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik. Diese Situation spiegelte sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Diesmal wurde bei der Konzeption der 4 Einzelproben eine Verdünnungsreihe von *B. garinii* Stamm PBr angefertigt und an die Teilnehmer versandt, wie auch bereits bei einem der vorhergegangenen Pro-

benpanels mit einem *B. burgdorferi* sensu stricto Stamm praktiziert.

Der aktuell eingesetzte Stamm PBr wurde aus Liquor einer Patientin mit Neuroborreliose isoliert und als *B. garinii* OspA-Typ 3 klassifiziert. In einer Studie konnten wir diesen OspA-Typ als zweithäufigsten *B. garinii* OspA-Typ in Zecken identifizieren, dagegen nur bei 8 von 242 Patientenisolaten.

Zur kurzen Rekapitulation: Mittlerweile sind 18 verschiedene dem *B. burgdorferi* sensu lato Komplex zugehörige Spezies beschrieben, die selbstverständlich auch entsprechende Unterschiede bei verschiedenen Zielgenen aufweisen. Von besonderem Interesse – da gesichert humanpathogen und weit in Europa verbreitet – sind *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* und die aktuell als neue Spezies akzeptierte *B. bavariensis*. Als möglicherweise humanpathogen werden *B. bissetii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* eingestuft. Bezogen auf das OspA zeigt insbesondere *B. garinii* eine auffällige Heterogenität mit wenigstens 5 verschiedenen genetisch differenzierbaren Typen.

Im Umfeld des aktuellen Ringversuchs wollten wir uns bei der Auswahl von Art und Menge der Zielorganismen auf die Abprüfung der analytischen Sensitivität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *B. garinii* PBr (# 1315353, $\sim 10^6$ Organismen/mL), eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1315352, $\sim 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1315351, $\sim 10^4$ Organismen/mL) sowie eine Probe mit etwa tausendfach geringerer Menge (# 1315354, $\sim 10^3$ Organismen/mL).

Die positive Probe # 1315353 (*B. garinii*, $\sim 1 \times 10^6$ Organismen/mL), wurde von 117 (98%) der insgesamt 119 Teilnehmer als positiv befundet, lediglich 2 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Probe # 1315352 mit ca. 10^5 *B. garinii* Zielorganismen/mL wurde von 112 (94%) der Teilnehmer als richtig positiv erkannt, 6 Teilnehmer berichteten ein falsch negatives, 1 Teilnehmer ein fragliches Ergebnis. Immerhin noch 108 (91%) der Teilnehmer identifizierten die Probe # 1315351 mit ca. 10^4 Zielorganismen/mL als richtig positiv, während 10 bzw. 1 Teilnehmer die Probe als falsch negativ bzw. fraglich beurteilten. Bei der mit 10^3 Zielorganismen/mL niedrig konzentrierten Probe # 1315354 sank die Rate der richtig positiven Ergebnisse doch deutlich auf 70% (n=83) der Teilnehmer ab. Diese Probe, die bei gutem Extraktionsprotokoll bei etwa 10^1 Genomäquivalenten pro PCR-Ansatz liegen dürfte, darf als edukative Probe eingestuft werden und Zielsituation für die eher anspruchsvollere PCR.

Falsch-negative Ergebnisse insbesondere bei den beiden hoch positiven Proben sollte den entsprechenden Teilnehmern Anlass geben, ihre Testsysteme einschließlich der Aufarbeitung und DNA-Extraktion einer eingehenderen Prüfung zu unterziehen.

Diesmal haben nur noch 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 61 der 119 Teilnehmer eingesetzt. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen (Sensitivität 93%) und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (in-house) Testsystemen (Sensitivität 85%) zu beobachten. Signifikante Inhibitionsereignisse der PCR-Reaktion wurde im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem der Teilnehmer beobachtet.

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 (9x), EliGene *Borrelia* LC von Elisabeth Pharmacon (3x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), TIB Molbiol LightMix *Borrelia* (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), Artus *Borrelia* LC Kit (1x), BactoReal *B. burgdorferi* von Ingenetix (1x), Attomol *Borrelia burgdorferi* Realtime (1x), Attomol *Borrelia burgdorferi*-DNA-LINA (1x), RapidSTRIPE *Borrelia* Assay von Analytik Jena (1x), und *Borrelia* real time PCR kit von Gerbion (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Aufgrund zahlreicher Anfragen hier eine wichtige Anmerkung vorab: 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. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila* DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal eine relativ stark positive Probe # 1315363, die mit einer Menge von ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* Serogruppe 3 versetzt war, sowie eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1315364, ca. 10^4 CFU/mL) an *Legionella pneumophila* Serogruppe 3. Die Probe # 1315362 des aktuellen Sets enthielt ca. 5×10^4 CFU/mL an *Legionella micdadei*. Die „negative“ Probe # 1315361 des aktuellen Probensets enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli*. Letztere wurde erfreulicherweise von 96 der insgesamt 98 Teilnehmer als negativ für *Legionella pneumophila* DNA befundet. Dies spricht wieder einmal für ein gutes Funktionieren von Test- bzw. labor-spezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Die relativ stark positive Probe # 1315363 mit ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* wurde diesmal von allen 98 Teilnehmern korrekterweise als positiv

befundet. Die etwa 10-fach geringere Menge an *Legionella pneumophila* Zielorganismen in Probe # 1315363 konnte immerhin noch von 92 Teilnehmern mit ihren jeweiligen speziesspezifischen PCR-Testsystemen erfolgreich nachgewiesen werden.

Probe # 1315362 enthielt mit ca. 5×10^4 Organismen pro mL eine nennenswerte Menge an *L. micdadei*, deren DNA in den jeweiligen *L. pneumophila*-spezifischen PCR-Testsystemen von 91 Teilnehmern keine Kreuzreaktionen und die damit verbundenen falsch-positiven Ergebnisse zeigte. Unter den 6 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis fanden sich überwiegend eigenentwickelte *real-time* PCR Protokolle mit 16S rDNA, dem *omp*- oder dem *mip*-Gen als spezifische Zielsequenz, sowie ein *nested* Block-Cycler PCR-Protokoll zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte. Letzteres Testkonzept sollte jedoch in jedem Fall die Unterscheidung zwischen *L. pneumophila* und *L. micdadei* erlauben, zumal sich diese Spezies auf Ebene der ribosomalen Speziesmarker deutlich voneinander unterscheiden.

Falsch-positive Ergebnisse bei den Proben # 1315361 und # 1315362 sollten bei den betroffenen Ringversuchsteilnehmern zudem Anlass zur Überprüfung und Optimierung der Speziesspezifität ihres jeweiligen *Helicobacter pylori*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben.

In Anbetracht der Reihenfolge der 4 ausgesandten Proben ist diesmal zudem das Vorliegen von Kontaminationsereignissen durch Verschleppung o.ä. aus den *L. pneumophila*-positiven Proben während der individuellen Probenaufarbeitung oder Prozessierung eher unwahrscheinlich (die beiden positiven Proben finden sich an Position 3 und 4 der Probenserie).

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 43 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit von (10x), AmpliGnost *L. pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), GeneProof *L. pneumophila* PCR Kit (3x), Mikrogen Diagenode Lpn-050 Kit (3x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE detection (2x), Immundiagnostik MutaREX *L. pneumophila* (1x), TIB Molbiol LightMix *Legionella* (1x), Ingenetix Bacto Real *L. pneumophila* (1x), Minerva Onar Lp (1x), Gerbion diarella *Legionella* real time PCR Kit LC und TM(1x), Congen Sure Aqua *L. pneumophila* (1x) und Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x).

Von den anderen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (in-house) NAT Testsysteme verwendet. Inhibitionskontrollen wurden von 96 der 98 Teilnehmer durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal bei 3 der insgesamt 392 mitgeteilten Testergebnisse beobachtet.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt je zwei Proben mit relativ hoher Menge an *Salmonella enterica* Serovar Typhi (# 1315371 mit $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL und # 1315372 mit $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie eine Probe mit *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis (# 1315374 mit $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) und eine Probe ohne Zielorganismen (# 1315373), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Insgesamt waren lediglich drei falsch-negative Ergebnisse bei den positiven Proben # 1315372 und # 1315374 sowie ein falsch-positives Ergebnis bei der „negativen Probe“ # 1315373 zu beobachten. Im direkten Vergleich zu manchen der vorhergehenden Ringversuchsrunden deutet dies auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieses Ringversuchs zum NAT-gestützten Nachweis von Salmonellen von den insgesamt 11 Teilnehmern 10 korrekte Ergebnisse bei der negativen Probe # 1315373 sowie bei der positiven Probe # 1315371 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen mitgeteilt. Lediglich die etwas schwächer positive Probe (# 1315372; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) wurde von 2 Teilnehmern falsch-negativ befundet und bei der Probe # 1315374 (*Salmonella enterica* ser. Enteritidis $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) wurde ein falsch-negatives Ergebnis mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit wieder erfreulich hoch.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: Diarella *Salmonella* real time PCR Kit von Gerbion (1x).

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

RV 538: *Listeria spp.*

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies

bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. So wie im Fall der Probe # 1315381, die diesmal eine relativ hohe Menge an *L. ivanovii* enthielt. Im Gegensatz zu einigen der vorhergegangenen Ringversuche, bei denen durch die nahezu ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen bestimmte Proben bei keinem der Teilnehmer zu positiven Ergebnissen geführt hatte, wurde die Probe mit *L. ivanovii* von drei der insgesamt 31 Teilnehmer als positiv für *Listeria* spp. DNA getestet. Hintergrund dieser zumindest auf den ersten Blick etwas irritierenden Ergebniskonstellation in der statistischen Auswertung (Tab. 2, siehe Anhang 1, S. 11) ist die fast ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen, die keine selektive Detektion bzw. differenzierte Erfassung von non-*monocytogenes* Listerienspezies erlauben. Im Umkehrschluss spricht diese Datenlage dann für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme bei 30 der insgesamt 31 Teilnehmer. 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.

Im aktuellen Ringversuch sollte über die Aussendung von einer Probe mit relativ geringer Menge an *L. monocytogenes* Zielorganismen wieder einmal die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abgeprüft werden. Probe # 1315384 enthielt folglich mit $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL eine relativ geringe Menge an *L. monocytogenes*, die erfreulicherweise von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich einer der insgesamt 31 Teilnehmer berichtete hier ein negatives Ergebnis – vermutlich wurde in diesem Fall ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität verwendet. Bei die Proben ohne Zielorganismen (# 1315382 und # 1315383), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielten, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet.

Da wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, dass bei vielen Fragestellungen das „technisch machbare“ nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem „diagnos-

tisch sinnvollen“ ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung in der Abprüfung der analytischen Spezifität individueller Testkonzepte. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch auch wieder standardisierter Rückstellproben mit non-monocytogenes Listerien zur Verfügung, die direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

Von allen 31 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionseignisse 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) 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** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise Nasenabstrichen) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen an entsprechenden Zielorganismen. Für interessierte Teilnehmer soll an dieser Stelle noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, dass sich mit Testsystemen, die üblicherweise für die Kulturbestätigung von *S. aureus* und/oder MRSA ausgelegt sind, diese geringen Mengen nicht immer zuverlässig nachweisen lassen werden. Eine Teilnahme an diesem Ringversuch ist daher nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs erfreulich kurz gehalten werden. Da wir diesmal, abgesehen von der „interessanten“ Probe #1315393, keine „schwierigen“ oder komplexen Probenkonstellationen (die jedoch in der täglichen Praxis bekanntermaßen durchaus vorkommen können) versandt haben, wurden von den insgesamt 259 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchgehend korrekte PCR Ergebnisse für 3 der insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet.

Wie in Tab. 1 der statistischen Auswertung dargestellt (siehe Anhang 1, S. 12), enthielt die Probe # 1315393 eine relativ niedrige Menge eines sog. LA-MRSA Patientenisolats (*lifestock associated* (LA)-MRSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). Probe # 1315391 enthielt ein typisches MRSA Patientenisolat (MRSA; PVL-negativ,

$\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Probe # 1315394 enthielt diesmal ein Methicillin-resistentes *Staphylococcus haemolyticus* Isolat ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). Die letzte der 4 Proben, # 1315392, enthielt neben humanem Zellmaterial lediglich eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Auch wenn sich in der MRSA-positiven Probe # 1315391 eine relativ hohe Menge an entsprechenden Zielorganismen befand, so ist die diesmal beobachtete Richtigkeitsquote von 99% als durchaus respektabel zu bezeichnen. Erfreulicherweise wurden für diese Probe von 256 der insgesamt 259 Teilnehmer korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt. Der Hintergrund des einen als „fraglich“ klassifizierten Ergebnisses bei dieser Probe ist seitens des Ringversuchsleiters nicht näher zu ergründen.

Auch die beiden MRSA-negativen Proben # 1315392 und # 1315394 wurden von jeweils 257 bzw. 252 Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten MRSA-spezifischen Testsystemen als „negativ“ getestet. Lediglich ein Teilnehmer beobachtete bei der Probe # 1315392 ein falsch-positives Ergebnis und ein Teilnehmer hatte sein Ergebnis hier als „fraglich“ klassifiziert.

Die insgesamt 7 falsch-positiven Ergebnisse bei der Probe # 1315394 (*mecA*-positiver *S. haemolyticus*) könnten wohl am ehesten auf isoliert auftretende Kontaminationsereignisse mit MRSA DNA während der Probenaufarbeitung oder Amplifikation bzw. Detektion verursacht worden sein. Auch eine mangelnde analytische Spezifität der verwendeten Testsysteme könnte hier als Ursache für mögliche Kreuzreaktionen in Frage kommen – im Gegensatz zu manch früheren Ringversuchsrunden (bei denen auch Proben mit Gemischen aus *mecA*-positiven Coagulase-negativen Staphylokokken und *mecA*-negativen *S. aureus* Isolaten ausgesandt wurden) ist in dieser Probe neben dem Oxacillin-resistenten CoNS jedoch kein MSSA anwesend.

Aber solche „Ausreißer“ sind bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 200 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion. Insgesamt bleibt festzuhalten, dass der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen bei der einen positiven Probe und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei den 2 MRSA-negativen Proben erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Die augenscheinlich „schlechte Datenlage“ bei der MRSA-positiven Probe # 1315393 ist bei näherer Betrachtung schnell erklärt. Hierbei handelt es sich um ein *S. aureus* Patientenisolat, das mit molekulargenetischen Typisierungsverfahren den sogenannten **lifestock associated (LA)-MRSA**s zugeordnet wird. Kurz gesagt handelt es sich hierbei um bestimmte Oxacillin-resistente *S. aureus* Isolate, charakteristischerweise vom MLST Typ 398, die auf Gesamtgenomebene alle üblicherweise verwendeten *S. aureus* Marker sowie ein funktionelles *mecA* Gen mit typischer Gensequenz tragen, sich in der SCC*mec*-orfX Region aber auf Sequenzebene geringfügig von den „typischen“ MRSA Isolaten unterscheiden. Diese Sequenz-

unterschiede können unter Umständen dazu führen, dass solche LA-MRSA Isolate nicht mit allen kommerziellen oder *in house* SCCmec basierten PCR-Testsystemen sicher erfasst und/oder auch eindeutig als MRSA detektiert werden können. Wie die Bezeichnung schon vermuten lässt, finden sich solche Isolate vermehrt im landwirtschaftlichen oder veterinärmedizinischen Bereich und gewinnen dadurch auch aus diagnostischer Sicht (z.B. bei der Definition von „Risikogruppen“ für PCR-gestütztes MRSA Aufnahmescreening) zunehmend an Bedeutung. LA-MRSA Isolate werden derzeit hauptsächlich in Schweinebeständen, aber auch bei anderen Nutztieren beobachtet. Die mit dem zunehmenden Auftreten solcher LA-MRSA Isolate verbundene Problematik wird in der aktuellen Literatur sowohl unter infektiologischen als auch epidemiologischen Gesichtspunkten diskutiert und hat mittlerweile auch schon in die MRSA-Screeningkriterien (Definition von „Risikopatienten“) Einzug gefunden. Literaturstellen wären hier beispielsweise: [1], [2].

Aus diagnostischer Sicht ist möglicherweise auch die einfache Differenzierungsmöglichkeit von LA-MRSA Isolaten mit bestimmten in-house oder kommerziell verfügbaren PCR Testsystemen interessant [3].

Im aktuellen Ringversuch wurden bei der LA-MRSA Probe # 1315393 von 246 Teilnehmern korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt, bei 10 Teilnehmern wurde jeweils ein falsch-negatives Ergebnis beobachtet und 3 Teilnehmer haben das Ergebnis ihrer MRSA-spezifischen PCR als „fraglich“ klassifiziert. Letztere 3 Teilnehmer gaben die Verwendung des Roche „LC MRSA Advanced“ Testkits an. Da bei diesem real-time PCR Testsystem beim Vorliegen von LA-MRSA Isolaten ein abweichender Schmelzpunkt der Hybridization Probes zu beobachten ist (siehe zuvor aufgeführte Euro Surveillance-Veröffentlichung), ist die Klassifizierung der Ergebnisse als „fraglich“ bei Probe # 1315393 methodisch auch vollkommen nachvollziehbar.

Ungeachtet des verwendeten PCR/NAT-Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen im Probenmaterial ein negatives MRSA Ergebnis für die besagte LA-MRSA Probe ausnahmsweise nicht als „falsch-negativ“ bewertet. Die 10 Teilnehmer mit falsch-negativen Ergebnissen bei Probe # 1315393 sollten dies jedoch dennoch als Anlass zur Überprüfung und Optimierung der Spezifität bzw. Sensitivität ihres jeweiligen MRSA-spezifischen NAT-gestützten Testsystems nehmen.

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

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Patho-

genitätsfaktors **PVL (Panton-Valentine Leukozidin)** bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 184 der insgesamt 259 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und mit Ausnahme eines Teilnehmers waren diesmal die (negativen) Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchwegs korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise unter [4], [5]. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus* Isolaten findet sich beispielsweise in [6].

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience FluoroType MRSA (6x), BD Max GeneOhm MRSA (5x), Alere detect ready MRSA Panel Plus (5x), HAIN Lifescience Genotype MRSA (3x), HAIN Lifescience Genotype Staphylococcus (3x), r-biopharm RIDAGENE MRSA PCR (3x), r-biopharm test kit (1x), Sentosa SA MRSA PCR test von VELA diagnostics (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x), Congen Sure line MRSA (1x) und Diarella MRSA real time PCR Kit TM von Gerbion (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 dargestellt (siehe Anhang 1, S. 14), enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit sehr hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1315402; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ IFU/ml) und eine Probe mit etwa tausendfach geringerer Menge (# 1315404; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), eine Probe mit ca. $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml an *Legionella pneumophila* (# 1315401), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1315403), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie bereits in den vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tab. 2 auf-

geführten Daten (siehe Anhang 1, S. 14) ist zu entnehmen, dass im aktuellen Ringversuch alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1315402 sicher und zuverlässig nachweisen konnten.

Mit ca. 10^3 IFU pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1315404 diesmal eine relativ geringe Menge an *C. pneumoniae* Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 104 der insgesamt 109 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet.

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen 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 gekennzeichnet (siehe Anhang 1, S. 14). Angesichts der mit 1×10^3 IFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als „äußerst gering“ zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei Probe # 1315404 den betroffenen 5 Ringversuchsteilnehmern dennoch Anlass zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Denn aus vergleichbaren Proben der Ringversuche im April 2009 und November 2008 mit einer Menge von ca. 10^2 IFU/mL an *C. pneumoniae* im Probenmaterial (die damals nur noch von ca. zwei Drittel der Teilnehmer erfolgreich detektiert werden konnten) wird deutlich dass die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA wohl eher bei 10^2 IFU/mL als bei 10^3 IFU/mL an *C. pneumoniae* angesiedelt ist.

Erfreulicherweise wurden für die Probe # 1315401 (*Legionella pneumoniae*) von keinem der insgesamt 109 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet.

Bei der negativen Probe # 1315403 (nur *E. coli*) wurden von 107 Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse berichtet. Bei den verbleibenden 2 falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich vermutlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Kreuzreaktivitäten der *C. pneumoniae*-spezifischen PCR Testsysteme mit *E. coli* erscheinen eher als unwahrscheinlich.

Bis auf einen Teilnehmer haben alle entweder kommerzielle oder selbstentwickelte (in-house) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae* DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion bei den vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs wurde dabei von keinem der Teilnehmer beobachtet. 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 13 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems, von 8 Teilnehmern der

Diagenode MP/CP Kit und von 2 Teilnehmern der kommerzielle AmpliGnost CP PCR Kit angegeben. Bis auf ein einzelnes falsch-negatives Ergebnis bei Verwendung des Diagenode MP/CP Kits konnten damit alle Teilnehmer durchwegs Richtigkeitsquoten von 100%, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen.

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 (8x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (7x), AmpliGnost *C. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (5x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma/Chlamydophila pneumoniae* Real Time PCR (2x), Biomerieux Argene Chla/Myco pneumo r-gene (2x), Immundiagnostik MutaPLATE *C. pneumoniae* (1x), Vircell Speed-oligo *Chlamydophila pneumoniae* (1x), Seegene Seeplex (1x), Ingenetix Bacto Real *Chlamydophila pneumoniae* (1x) und Mikrogen FTD Real Time PCR (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tab. 1 dargestellt (siehe Anhang 1, S. 15), enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1315414; *M. pneumoniae*, $\sim 10^6$ Genomkopien/mL), eine mit ca. zehnfach geringerer Menge (# 1315412; *M. pneumoniae*, $\sim 10^5$ Genomkopien/mL), eine Probe mit ca. hundertfach geringerer Menge (# 1315413; *M. pneumoniae*, $\sim 10^4$ Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1315411), die nur humanes Zellmaterial und *E. coli* enthielt.

Insgesamt betrachtet wurden von den Teilnehmern im Rahmen der aktuellen Ringversuchsrunde zumindest für 3 der insgesamt 4 Proben wieder erfreulich hohe Richtigkeitsquoten erzielt. Mit Ausnahme eines Teilnehmers konnten diesmal alle der insgesamt 119 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae* Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1315414 problemlos und zuverlässig nachweisen. Der zuverlässige Nachweis von *M. pneumoniae* DNA in der etwas schwächer positiven Probe # 1315412 gelang allen 119 Teilnehmern. Selbst bei der schwach positiven Probe # 1315413 (ca. 10^4 Genomkopien/mL) wurden lediglich von 8 Teil-

nehmern falsch-negative Ergebnisse beobachtet. Zwei Teilnehmer klassifizierten ihr Ergebnis hier als „fraglich“. Die „negative“ Probe # 1315411, die anstelle von Zielorganismen lediglich *E. coli* enthielt, wurde diesmal von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen *M. pneumoniae*-spezifischen Testsystemen als negativ befundet. Bei dem einen falsch-positiven Ergebnis handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung oder um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sein könnten.

Insgesamt deutet diese Ergebnislage auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden (und nicht nur dann, wenn sich diese negative Probe als Nummer 1 innerhalb des so versandten und vermutlich auch so abgearbeiteten 4-er Sets befindet).

Die diagnostische Performance eines etablierten *in-house* Protokolls und ausgewählter kommerzieller NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae* DNA wurde im Sollwertlabor für RV 541 (Prof. Jacobs und Dr. Dumke, Dresden) im Rahmen einer systematischen Studie untersucht. Auch hier erwiesen sich diese Testsysteme als spezifisch, sensitiv und auch zuverlässig bezüglich der Erfassung aller relevanten *M. pneumoniae* Subtypen und Varianten [7].

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 56 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=10], Minerva Venor Mp Testsystem [n=1], AmpliGnost MP PCR Kit [n=2], Diagenode MP/CP [n=9], sowie „andere kommerzielle Testsysteme“ [n=34]. Teilnehmer mit den ersten drei der aufgeführten Testkits konnten damit durchwegs Richtigkeitsquoten von 100%, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (7x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (6x), AmpliGnost *M. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma/Chlamydia pneumoniae* Real Time PCR (2x), Biomérieux Argene Chla/Myco pneumo r-gene (2x), Minerva biolabs Intego PCR Kit (1x), Vircell Speed-oligo *Mycoplasma pneumoniae* (1x), Immundiagnostik MutaREAL *M. pneumoniae* (1x), Seegene PneumoBacter ACE detection (1x), Ingenetix Bacto Real *Mycoplasma pneumoniae* (1x), Mikrogen FTD Real Time PCR (1x) und Mikrogen FTD Respiratory pathogens 21 (1x).

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

Dieser seit kurzem neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene kombinierte Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii* & *Bacillus anthracis* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum **Direktnachweis geringer Mengen an *Coxiella burnetii* und *Bacillus anthracis* DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit verschiedenen Mengen an *Coxiella burnetii* ($\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1315421 und $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL in Probe # 1315422), zwei Proben mit 10-fach unterschiedlicher Menge an *Bacillus anthracis* DNA ($\sim 5 \times 10^3$ Genomkopien/mL in Probe # 1315421 und $\sim 5 \times 10^4$ Genomkopien/mL in Probe # 1315424), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1315423), 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 Tab. 2 und 3 sowie für *Bacillus anthracis* in Tab. 4 und 5 (siehe Anhang 1, S. 16 und 17).

Coxiella burnetii:

Die etwas stärker positive Probe # 1315422 mit ca. 10^5 Genomkopien *C. burnetii* /mL wurde diesmal von allen der insgesamt 21 Teilnehmer als positiv befundet. Auch die Probe # 1315421 des aktuellen Probesets mit einer etwa hundertfach geringeren Menge an *C. burnetii*, wurde ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Lediglich ein Teilnehmer (der die Verwendung eines nicht näher spezifizierten *in house* PCR Testsystems im Ergebnisbogen aufgeführt hat) berichtete hier ein falsch-negatives Ergebnis.

Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus den vorherigen Ringversuchen – Schwierigkeiten beim zuverlässigen Nachweis von *C. burnetii* DNA traten damals erst bei Proben mit weniger als ca. 10^3 Genomkopien pro mL auf. Diese untere Nachweisgrenze bestätigt sich offenbar auch im aktuellen Ringversuch.

Anmerkung des Ringversuchsleiters: Bei einer DNA-Aufreinigung aus 100 μ l Probenmaterial, einer Elution in 100 μ l (also ca. 100 Genomkopien in 100 μ l) und der Verwendung von 5 μ l template input entspricht diese Menge ca. 5 Genomkopien pro NAT-Reaktionsansatz. Abhängig von der verwendeten Zielsequenz des jeweiligen PCR-Testkonzepts muss dabei noch die Kopienzahl der entsprechenden Zielsequenz im Genom berücksichtigt werden (z.B. liegen ribosomale Gene wie die 16S rDNA

typischerweise in 2 bis 10 Kopien pro Bakteriengenom vor und bei den unterschiedlichen erregerspezifischen Zielsequenzen muss zwischen sog. *multi-copy* und *single-copy targets* differenziert werden).

Neunzehn der insgesamt 21 Teilnehmer gaben die Verwendung eines eigenentwickelten (*in house*) PCR Testkonzepts an; bei drei dieser Teilnehmer war explizit das „Transposase Gen (IS1111)“ als Zielsequenz vermerkt. Zwei der Teilnehmer verwendeten den vorkonfektionierten LightMix *C. burnetti* Kit der Fa. TIB Molbiol (Berlin) und beobachteten hiermit durchgehend korrekte Ergebnisse. Die selbstentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum NAT-gestützten Nachweis von *C. burnetti* DNA aller Teilnehmer enthielten eine Inhibitions- und/oder Positivkontrolle. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Bacillus anthracis:

Die Ergebnislage des im Rahmen der aktuellen Ringversuchsrunde neu eingeführten Ringversuchs „Bacillus anthracis DNA“ ist relativ schnell dargestellt und diskutiert.

Alle der 10 Teilnehmer konnten mit ihren jeweils vor Ort etablierten *Bacillus anthracis* spezifischen PCR/NAT-gestützten Testsystemen die beiden positiven Proben mit ca. 5×10^3 Genomkopien/mL (# 1315421) und mit ca. 5×10^4 Genomkopien/mL (# 1315424) an *Bacillus anthracis* DNA erfolgreich nachweisen.

Ebenfalls von allen der 10 Teilnehmer wurden korrekt negative Ergebnisse für die Proben ohne entsprechende Zielorganismen # 1315423 (nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen) sowie # 1315422 (nur *Coxiella burnetii* mit ca. 10^3 Genomkopien/mL und eine Suspension aus humanen Zellen) beobachtet. Insgesamt doch wohl eine sehr erfreuliche Gesamtsituation...

Und zudem stehen nach erfolgreichem Abschluss der aktuellen Ringversuchsrunde den Kolleginnen und Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen für *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

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

Wie in Tab. 1 dargestellt (siehe Anhang 1, S. 18), enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal nur zwei

positive Proben: Probe # 1315432 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (*F. tularensis*, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) und Probe # 1315433 mit ca. hundertfach geringerer Menge (*F. tularensis*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL). Im Ringversuchprobenset befanden sich zudem zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1315431 und # 1315434), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielten.

Ähnlich wie bei dem zuvor diskutierten Ringversuch haben auch hier alle der 11 Teilnehmer die relativ stark positive Probe # 1315432 mit ihren NAT-gestützten Testsystemen korrekt identifiziert. Gleichfalls wurden die *F. tularensis*-negativen Proben # 1315431 und # 1315434 von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet. Dies spricht für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Auch die im Vergleich zu # 1315432 etwa hundertfach schwächer *F. tularensis*-positive Probe # 1315433 des aktuellen Probesets wurde von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Lediglich zwei der 11 Teilnehmer (einer mit kommerziellem Testsystem und einer mit einem eigenentwickelten *in house* PCR Testkonzept) berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen bezüglich unterer Nachweisgrenzen aus vorherigen Ringversuchen. 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 Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Auch wenn die Anzahl der teilnehmenden Laboratorien bei der aktuellen Ringversuchsrunde noch nicht sehr hoch ist, so kann die aktuelle Ergebniskonstellation als orientierender Hinweis darauf angesehen werden, dass die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *F. tularensis* DNA unterhalb einer Menge von ca. 10^4 Organismen/mL Probenmaterial liegen dürfte.

RV 560: Pneumocystis jirovecii

Der RV 560 „Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*“ war so konzipiert, dass er der RV-Leitung einen Überblick über die verfügbaren NAT-gestützten Methoden und Protokolle **zum Direktnachweis von Pneumocystis jirovecii DNA** in geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien verschaffen sollte. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwendungsbereich etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe (siehe auch Tab. 1 (Anhang 1, S. 19)): eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1315601; *Pneumocystis jirovecii*, ca. 3×10^6 Genomkopien/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1315602; *Pneumocystis*

jirovecii, ca. 4×10^5 Genomkopien/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1315603; *Pneumocystis jirovecii*, 3×10^4 Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1315604), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Erfreulicherweise hat sich auch in der aktuellen Ringversuchsrunde die überaus gute Ergebnislage des im November 2012 durchgeführten Proberingversuchs bestätigt. Sowohl die relativ stark positive Probe # 1315601 mit ca. 3×10^6 Genomkopien/mL sowie die etwa 10-fach schwächer positive Probe # 1315602 mit ca. 4×10^5 Genomkopien/mL wurde von allen der insgesamt 66 Teilnehmer als positiv befundet. Selbst in der DNA-Präparation aus der etwas schwächer positiven Probe # 1315601 (ca. 3×10^4 Genomkopien/mL) gelang noch nahezu allen der teilnehmenden Laboratorien ein sensitiver und spezifischer Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA mit ihren jeweils etablierten qualitativen oder quantitativen PCR-Testsystemen. Lediglich einer der insgesamt 66 Teilnehmer berichtete bei dieser Probe ein falsch-negatives Ergebnis – vermutlich wurden in diesen Fällen Testsysteme mit etwas schlechterer analytischer Sensitivität verwendet. Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1315604), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] „Andere kommerzielle Testsysteme“ zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: AmpliGnost *P. jirovecii* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x) und TIB Molbiol LightMix *Pneumocystis jirovecii* (1x).

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

Aufgrund der noch relativ geringen Teilnehmerzahl bei den Ringversuchen RV 542, RV 543 und RV 560 sowie der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit noch 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.

Anhänge

Verfügbar unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2013-4/lab000010.shtml>
1. Anhang 1_lab000010.pdf (341 KB)

Ergebnisse der Ringversuchsserie „Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis (PCR/NAT)“ 2013

Literatur

1. Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Köksal M, Jurke A, Becker K, Friedrich AW. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One*. 2013;8(2):e55040. DOI: 10.1371/journal.pone.0055040
2. Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, Deurenberg RH, Voss A, Beckh K, Friedrich AW. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Nov;28(11):1375-82. DOI: 10.1007/s10096-009-0795-4
3. Reischl U, Frick J, Hoermansdorfer S, Melzl H, Bollwein M, Linde HJ, Becker K, Köck R, Tuschak C, Busch U, Sing A. Single-nucleotide polymorphism in the SCCmec-orfX junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains. *Euro Surveill*. 2009 Dec 10;14(49):pii=19436
4. 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
5. 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
6. 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
7. Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47: 441-4. DOI: 10.1128/JCM.01989-08

Korrespondenzadresse:

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

Bitte zitieren als

Reischl U, Straube E, Maaß M, Jacobs E, Schneider W, Fingerle V, Busch U, Frangoulidis D, Splettstösser W, Grass G, Reiter-Owona I. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2013 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2013;4:Doc03. DOI: 10.3205/lab000010, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000102

Artikel online frei zugänglich unter

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2013-4/lab000010.shtml>

Veröffentlicht: 22.07.2013

Copyright

©2013 Reischl et al. Dieser Artikel ist ein Open Access-Artikel und steht unter den Creative Commons Lizenzbedingungen (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.de>). Er darf vervielfältigt, verbreitet und öffentlich zugänglich gemacht werden, vorausgesetzt dass Autor und Quelle genannt werden.

Bacterial and fungal genome detection PCR/NAT: discussion of the May 2013 distribution for external quality assessment of nucleic acid-based protocols in diagnostic medical microbiology by INSTAND e.V.

Abstract

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

A highly desired scheme for external quality assessment (EQAS) of molecular diagnostic methods in the field of medical microbiology was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. This segment of the INSTAND e.V. proficiency testing program is open for diagnostic laboratories worldwide. The concept of this EQAS scheme, which is in accordance to the "Directive of the German Medical Association for quality assurance of medical laboratory examinations" (RiLiBÄK), part B3, is based on two validation rounds per year (spring and autumn) and a permanently expanding coverage of relevant bacterial or fungal pathogens. Briefly, next to "simply negative" samples the corresponding sets of quality control (QC) specimens may contain some strong-positive samples, samples spiked with clinical variants or species closely related to the target organisms. Further information as well as the statistically documented and discussed results of the past rounds of this proficiency testing scheme "Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)" can be found at the homepage of INSTAND e.V. (<http://www.instand-ev.de>). Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least a brief discussion of the results and some key issues in English and keep the tables in a bilingual style.

Udo Reischl¹
Eberhard Straube²
Matthias Maafß³
Enno Jacobs⁴
Wulf Schneider¹
Volker Fingerle⁵
Ulrich Busch⁵
Dimitrios Frangoulidis⁶
Wolf Splettstösser⁶
Gregor Grass⁶
Ingrid Reiter-Owona⁷

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

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

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

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

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

6 Bundeswehr Institute of Microbiology, Munich, Germany

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

Brief discussion of the current results

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

Examination results May 2013

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 similar amounts of *C. trachomatis* ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL and $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL; sample # 1315303 and sample # 1315301), two samples with equal amounts of *N. gonorrhoeae* (sample # 1315302 and sample # 1315304; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 1315301 with $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL of *N. gonorrhoeae*.

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells in the positive samples #1315301 and # 1315303, among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 170 participants, only 7 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 25 of the 170 participants for sample # 1315301, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of 1×10^3 CFU/mL, next to 5×10^3 CFU/mL of *C. trachomatis* organisms. For GO-positive samples # 1315302 and #1315304, which contained with 5×10^4 CFU/mL similar amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms, interestingly only 4 participants failed to detect *N. gonorrhoeae* DNA and only 8 false-negative results were reported from 170 participants. The reason for this finding, which was similarly observed in the November distribution, remains unclear. Competition of certain of primer sequences present in the complex reaction mixture could be a possible explanation. But one could assume that for chlamydial and gonococcal (duplex) NAT systems, specific amplification of specific genomic regions of these two different target organisms is realized via two different primer sets and the use of consensus primers is avoided. Since the amount of target organisms in sample # 1315301 (1×10^3 CFU/mL) could not be considered as "extremely low", false negative results should encourage the participants to review and optimize their respective gonococcal specific NAT-based test system.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two samples with similar amount ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL and $\sim 5 \times 10^3$ IFU/mL)

of *C. trachomatis* target organisms (# 1315314 and # 1315312) and two samples without target organisms (# 1315311 and # 1315313) containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*.

As depicted in Tab. 2 of statistical analysis (see Attachment 1, p. 4) for both positive samples the results were correct while for sample # 1315314 false-negative results were reported by only 2 of the 115 participants. For both *C. trachomatis*-negative samples # 1315311 and # 1315313, only 3 false-positive and 3 results classified as "questionable" were observed of the 115 participants. This striking match of the current results with observations and accuracy rates in previous interlaboratory tests can, at least indirectly, be considered as evidence of a high reliability and consistency of the used test systems and the processing of the samples.

Run controls were performed by 113 of the 115 participants and inhibition events were observed at 2 of the 460 test results. 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 115 participants of the current distribution.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1315322; 1×10^5 CFU/mL), one sample with an approximately hundredfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1315323; 1×10^3 CFU/mL), as well as two samples containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1315321 and # 1315324).

The availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only 1 of the 145 participants reported false-positive results for the *B. pertussis*-negative sample # 1315321. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation. A cross reaction due to a possible low specificity of the used PCR/NAT test system is unlikely, because the sample contained only *E. coli* cells. For sample # 1315323 (10^3 CFU/mL of *B. pertussis*) 6 false-negative results were observed. With an amount of 10^3 CFU/mL of *B. pertussis* target organisms the lower limit of detection of corresponding PCR assays or test systems is obviously reached.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used *in-house* test concepts with inhibition and/or positive controls. In the current distribution, 71 participating laboratories indicated the use of the IS481 insertion sequence, 12 the *B. pertussis* toxin coding gene and 3 the use of *B. pertussis*-specific ribosomal gene segments.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with a relatively high amount of target organisms. Sample

1315331 contained approximately 1×10^6 CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain, and sample # 1315333 contained approximately 1×10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori*. Only one of the 48 participants reported false-negative results for sample # 1315332, which contained only a suspension of *E. coli*. Therefore, cross reaction caused by low specificity of the used test is unlikely. Sample # 1315334 contained a culture suspension of *Campylobacter jejuni* ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), which therefore was correctly reported “negative“ by all of the 48 participants – indicating an overall good analytical specificity of the used PCR test systems.

As noted in the test 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 the amplification and sequencing of characteristic areas within the *H. pylori* 23 S rDNA or the sequence analysis of this genomic region by means of hybridization probes. Results were communicated by 32 of the 48 participants, and 27 of the results for molecular susceptibility testing were also correct.

RV 534: EHEC/STEC

As discussed before, the main challenge in NAT-based detection of EHEC/STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but rather the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenicity (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin). The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1315344 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-, *stx*₂-, *eae*-, *hlyA*- and O157-positive), and # 1315343 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*_{2c}-positive, EAEC positive, *stx*₂-negative, *eae*-negative, and *hlyA*-negative). Sample # 1315341 contained $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *Salmonella enterica* serovar typhi. The other EHEC-negative sample contained an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1315342).

Sample # 1315343 contained a very interesting *stx*_{2c}-positive EHEC isolate that contains genetic markers for enteroaggregative *E. coli* (EAEC) in addition to the shiga toxin gene. Even if this pathogenetic constellation is rather unusual, it is a good example for the surprising variety of clinical strains which may be encountered in microbiological routine PCR diagnostics of EHEC.

By the way, a number of PCR protocols have been developed for the genotypic detection of EAEC strains. Large plasmids, which are present in most EAEC strains and carrying genes coding for bundle-forming fimbriae and the production of EAEC heat-stable enterotoxin 1 (EAST1), are representing potential targets for a specific and sensitive detection. PCR assays targeting a cryptic open reading frame, which is adjacent to the plasmid replicon, turned out to be practicable as screening tests by detecting EAEC strains with a specificity and sensitivity of about 90%.

But now back to the current EHEC external quality assessment scheme: the availability of well-established NAT assays lead to high accuracy rates for correct results and 103 of the 110 participants reported correct results. The cause for the 5 false-negative results for *stx*-1c positive EHEC (# 1315343) and the 3 false-negative results for *stx*-1- and *stx*-2-positive EHEC isolate (#1315344) remains unclear. Maybe the common spectrum of *stx*-1 and *stx*-2 genes is not fully covered by the applied test systems. A false negative result in some PCR test systems could have been expected for *stx*-2f, because of the known little homology to other shiga toxin gene sequences, but a *stx*-2f EHEC positive isolate was not included this time. Interestingly, mainly commercial assays were affected producing false-negative results of sample # 1315343 and # 1315344. For sample # 1315341 containing significant amounts of *Salmonella enterica* Serovar Typhi, fortunately none of the 110 participants reported false positive results.

Since 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 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 were performed by 99 of the 110 participating laboratories and the reported results were correct when performed.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

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

Short recapitulation: So far 18 different species belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato complex were described, that naturally present genetic differences regarding popular target genes. Of special interest – since of assured human pathogenicity and widely distributed in Europe – are *B. burgdorferi* sensu stricto, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* and *B. bavariensis*. *B. bissetii*, *B. lusitaniae* und *B. valaisiana* are regarded as possibly human pathogen. Regarding OspA especially *B. garinii* showed a striking heterogeneity with 5 genetic distinguishable “genotypes”.

The current set of QC samples contained a kind of dilution series from *Borrelia garinii* organisms. A relatively high amount of *Borrelia garinii* ($\sim 1 \times 10^6$ organisms/mL) was present in sample # 1315353, which consequently was tested positive by 117 of the 119 participating laboratories. Sample # 1315352 contained $\sim 1 \times 10^5$ *Borrelia garinii*

organisms per mL (detected by 112 participants) and sample # 1315351 contained $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL still detected by 108 participants. For sample # 1315354, which contained a very low amount of target organisms ($\sim 1 \times 10^3$ organisms per mL), reported positive results dropped to 83 of the 119 participants. The last sample can be regarded as an educational one, the aim for the (near) future for the ambitious PCR.

The participants who reported false-negative results especially for the two high positive samples should check their NAT assay concepts including sample processing/DNA-extraction.

Only just under half of the participating laboratories used self-developed (in-house) tests with inhibition and/or positive controls. No inhibition and also no obviously significant differences to commercially available kits regarding sensitivity could be observed.

Next to the three commercial assays provided with a designated code number (Qiagen artus *Borrelia* LC Kit (Code [20]), Demeditec GenFlow (Code [21]) and LightMix *Borrelia* from TIB Molbiol (Code [22]), participants indicated the use of the following commercial assays or kits on their report form: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (9x), EliGene *Borrelia* LC from Elisabeth Pharmacon (3x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (2x), TIB Molbiol LightMix *Borrelia* (1x), EliGene *Borrelia* RT from Elisabeth Pharmacon (1x), Artus *Borrelia* LC Kit (1x), BactoReal *B. burgdorferi* from Ingenetix (1x), Attomol *Borrelia burgdorferi* Realtime (1x), Attomol *Borrelia burgdorferi*-DNA-LINA (1x), RapidSTRIPE *Borrelia* Assay from Analytik Jena (1x), und *Borrelia* real time PCR kit from Gerbion (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Due to numerous requests: this ring 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 a participation is promising for only for such diagnostic laboratories, which have established a highly sensitive and specific PCR-based method for the direct detection of *L. pneumophila* DNA or who want to evaluate this method in the course of an external quality control.

The current set of QC samples contained only two positive samples with *Legionella pneumophila* serogroup 3 (# 1315363; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and # 1315364; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), as well as one sample containing *Legionella micdadei* (# 1315362; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1315361 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) sample # 1315363 was correctly tested positive by all of the 98 participating laboratories. Sample # 1315364, which contained ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) *L. pneumophila* reported correctly by 92 of 98 participants.

Sample # 1315362 contained considerable amounts (5×10^4 CFU/mL) of *Legionella micdadei*, whose DNA showed no cross reactivity for 91 participants. The 6 participants with false-positive results were using mainly self-developed in-house real-time PCR protocols with *omp*-, *mip*-gene or 16S rDNA as target sequence.

However, colleagues who observed a cross-reaction with their in-house assays and are aiming at a high analytical performance should consider improving the sensitivity and/or checking the species coverage of their individual assay concepts.

Participants who reported false-positive results used mainly *in house* real-time PCR protocols with 16S rDNA-, *omp*- and *mip*-coding genes or a nested block-cycler PCR protocol with subsequent nucleotide sequencing of the amplified 16S rDNA region, which should allow however the distinction between *L. pneumophila* and *L. micdadei* in any case, since these species clearly differ at the level of the ribosomal marker genes. The presence of contamination events however is unlikely due to sample order.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained three positive samples with *Salmonella enterica*. A relatively high amount of the corresponding target organism was present in sample # 1315374 (*Salmonella enterica* serovar Enteritidis, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml), a similar amount was present in sample

1315371 (*Salmonella enterica* serovar Typhi, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), and an approximately tenfold lower amount was present in sample # 1315372 (*Salmonella enterica* serovar Typhi, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). No target organisms but only *E. coli* cells were present in sample # 1315373.

Only 3 false-negative result was reported for the positive samples # 1315372 and # 1315374, one false-positive result was reported for the negative sample # 1315373. In summary, 10 correct results for the negative sample # 1315373 as well as the positive sample # 1315371 with relatively high amount of target organisms were reported correctly for the NAT-based detection of *Salmonella* by the 11 participants. Only the slightly weaker positive sample (# 1315372; *Salmonella enterica* serovar Typhi, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was reported false negative by 2 participants and for # 1315374 (*Salmonella enterica* serovar Enteritidis $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL) one false negative result was reported.

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

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained two samples without the corresponding target organisms (# 1315382

and # 1315383; only *E. coli* cells), one sample positive for *L. monocytogenes* (# 1315384 with 1×10^4 CFU/ml) and one sample with *Listeria ivanovii* (# 1315381) as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*.

In order to test the specificity of individual test systems, the sample # 1315381 contained relatively high amounts of non-*monocytogenes* species: *L. ivanovii*. In contrast to some of the previous rounds of our external quality assessment schemes, where the almost exclusive use of *L. monocytogenes*-specific NAT test systems had led to no positive results, the sample with *L. ivanovii* was reported positive for *Listeria* spp. by three of a total of 31 participants. Once again, this constellation is caused by the almost exclusive use of *L. monocytogenes*-specific NAT-testsystems. On the other hand, these results indicate a pleasingly high specificity of the used *L. monocytogenes*-specific test systems in the laboratories of 30 participants.

In order to assess the analytical sensitivity and check the lower detection limit of the currently used NAT assays, we decided to include also weak positive samples in the current distribution. Relatively low numbers of *L. monocytogenes* cells ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) were present in sample # 1315384 and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays applied by 30 of the 31 participants.

No false-positive results were observed for samples # 1315382 and # 1315383 containing only human and *E. coli* cells, so it seems that the majority of participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

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 and/or community acquired (CA)-MRSA DNA in typical 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 natural background of human cells and other components. Here it is important to note that NAT assays designed for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set.

Despite of the "interesting" sample # 1315393, no "difficult" sample was included into the current panel. Almost consistently correct PCR results were observed for 3 of the 4 samples of the current panel by a total of 259 participants with their NAT-based test systems.

Sample # 1315393 of the current set contained a relative low amount of La-MRSA organisms (PVL-negative, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml).

Sample # 1315391 contained a methicillin-resistant *S. aureus* isolate (MRSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). Sample # 1315394 contained a clinical isolate of a methicillin-resistant *S. haemolyticus* strain (*mecA*-positive,

PVL-negative ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Negative sample # 1315392 consisted of human cells with considerable amounts of *E. coli* cells.

The two MRSA negative samples, # 1315394 and # 1315392 were tested by 257 or 252 respectively of 259 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems as "negative" and only one participant observed a false positive result for sample # 1315392. One participant reported a result classified as "questionable". Sample # 1315394 (*mecA*-positive *S. haemolyticus*) was reported with a false positive result by 7 participants. These 7 false positive results may have been caused probably most likely occurring in isolated events of contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection or by insufficient analytical specificity of the used test system.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion of participants reported a correct result and the predominantly correct positive findings for one positive sample and correct negative findings for the 2 MRSA negative samples. This indicates excellent sample workup functioning of laboratory-specific prevention measures to avoid the risk of contamination and carry-over events. The apparent "lack of recognition" for the MRSA positive sample # 1315393 is quickly explained on closer inspection. This sample contained a rather exotic *S. aureus* patient isolate, which belongs to the group of so-called **livestock associated (LA)-MRSA**. These *S. aureus* isolates with Oxacillin resistance, are typically of MLST type 398 and contain a functional *mecA* gene on the genomic level, but differ slightly in the nucleotide sequence of SCCmec-orfX region from typical MRSA isolates. These differences may under certain circumstances lead to false negative results for LA-MRSA with some commercial or in-house SCCmec-based PCR test systems and can so not be clearly identified as MRSA.

As obvious from the naming, LA-MRSAs can be found in the agricultural or veterinary field and are gaining importance from a diagnostic perspective (for example in the definition of "Risk groups" for PCR-based MRSA screenings). For further information: [1], [2], [3].

For the current set of QC samples correctly positive results for the LA-MRSA-positive sample # 1315393 were observed by 246 participants, a false negative result was reported by 10 participants and 3 participants have classified the result as "questionable". These latter 3 participants reported the use of the Roche LC MRSA Advanced test. Since a different ($\sim 4^\circ\text{C}$ lower) melting point of the hybridization probes is observed in this real time PCR assay when LA-MRSA organisms are present (see the above mentioned Eurosurveillance paper), the "false-negative" classification of the results with sample # 1315393 are a simple consequence of the underlying assay result interpretation software. However, due to the relatively low amount of target organisms in the sample material, a negative result was not assessed as "false negative" irrespectively of the PCR/NAT test system used. Altogether the observed results indicate, apart from sample # 1315393, a high reliability of the NAT-based

direct detection of MRSA in clinical specimens. In the context of our test series the 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 184 of the total 259 participating laboratories and within the current distribution the results for the molecular PVL testing were correct in all but one case.

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 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 materials. 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 # 1315402 was spiked with $\sim 1 \times 10^6$ IFU/ml of *C. pneumoniae* whereas sample # 1315404 contained an approximately thousand fold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml). Sample # 1315401 contained significant numbers of *Legionella pneumophila* organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1315403.

As depicted in Tab. 2 (see Attachment 1, p. 14), all participants reported correct results for the positive sample # 1315402. For positive sample # 1315404 with a lower concentration of target organisms (10^3 IFU/ml), still 104 from the 109 participants observed correctly positive results. Due to the relatively low amount of target organisms, results were not assessed in the course of issuing the certificates, but the 5 affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR/NAT assays. Comparable results from former rounds of our external quality assessment schemes (November 2008 and April 2009) let assume, that the "true" lower limit of detection is more in the scale of 10^2 IFU/mL of *C. pneumoniae* in appropriate sample material.

No participants reported false-positive results for sample # 1315401 (*Legionella pneumophila*) and only 2 false-positive results were observed for the "negative" sample # 1315403, which could be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. Overall there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 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 want to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. 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. As a consequence, diagnostic assays designed for *M. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *M. pneumoniae* infected cells in individual samples of the RV 541 distributions.

The current set of QC samples contained three positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^6$ genome copies/mL) was present in sample # 1315414, an approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1315412 and an approximately hundred fold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1315413. The set was completed by sample # 1315411, 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 surprisingly high percentage of correct results, at least for 3 of the 4 samples of the current set.

With the exception of one laboratory, all 119 participants reported correct *M. pneumoniae*-positive results for the relatively high positive sample # 1315414 and no participant reported false-negative results for sample # 1315412, which contained 10^5 *M. pneumoniae* genome copies/mL.

The weak positive sample # 1315413 (10^4 genome copies/mL) was tested correctly positive by 109 of the 119 participants and 2 participants classified their results as "questionable".

One participant reported false-positive results for the negative sample # 1315411, which could be due to cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

Overall, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

RV 542: Coxiella burnetii & B. 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 in typical sample

material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained two samples with different amounts of *Coxiella burnetii* organisms ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1315421 and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL in sample # 1315422), two samples with ten-fold different amounts of *Bacillus anthracis* (sample # 1315421 with $\sim 5 \times 10^3$ genome copies/mL and sample # 1315424 with $\sim 5 \times 10^4$ genome copies/mL) Sample # 1315423 contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms. For the ease of data presentation and analysis, we decided to depict the PCR/NAT results for the two different target organisms within this combined EQAS scheme in two separate tables: please see Tab. 2 and 3 for the *Coxiella burnetii*-specific results and Tab 4 and 5 for the *Bacillus anthracis*-specific results (Attachment 1, p. 16 and 17).

Coxiella burnetii:

A relatively high amount (10^5 genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms were present in sample # 1315422, which consequently tested positive by all of the 21 participating laboratories. Sample # 1315421, which contained an approximately hundred-fold lower number of *C. burnetii* target organisms per mL, was also tested positive for *C. burnetii* DNA by nearly all of the 21 participants. Similar to the result observed in past distributions of our external quality assessment schemes, difficulties for the reliable detection of *C. burnetii* DNA occurred sporadically for samples at or below 10^3 genome copies per mL – this target load should probably be considered as the lower limit of detection for this pathogen using current PCR/NAT assay concepts. 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 ring test is quickly presented and discussed. All of the 10 participants correctly reported positive results for both positive samples # 1315421 (5×10^3 genome copies /mL) and # 1315424 (5×10^4 genome copies /mL) and also all participants correctly reported negative results for both negative samples #1315423 (containing *E. coli* and human cells) and # 1315422 (103 genome copies of *Coxiella burnetii* in a suspension of human cells).

After this very successful round of external quality assessment, “standardized samples” are now available for colleagues who are interested in obtaining *B. anthracis* DNA positive material for assay validation purposes. Requests

for backup samples should be addressed to the EQAS coordinator (Prof. Reischl).

RV 543: Francisella tularensis

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *F. tularensis* DNA in typical sample material.** With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. The current set of QC samples contained only two positive samples: a high amount of *Francisella tularensis* holarctica ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) was present in sample # 1315432, and an approximately hundred-fold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1315433.

Similar to QC samples from past ring trials, positive sample #1315432 was correctly tested positive by all of the 11 participating laboratories. As no false-positive results were observed for the “negative” samples # 1315431 and # 1315434, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

Also the weaker positive sample # 1315433 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL of *F. tularensis*) of the current set was reliably detected by almost all participants with their specific PCR test systems and only two of the 11 participants (one has indicated the use of a commercial test system and one indicated the use of a proprietary *in house* PCR assay) reported false negative results. Overall, these results corroborate the 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 560: Pneumocystis jirovecii

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays **for the direct detection of *P. jirovecii* DNA in typical sample material.** With the development and composition of the corresponding sample materials we 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 a kind of dilution series of *Pneumocystis jirovecii* organisms in the sample matrix: sample # 1315601 contained about 3×10^6 genome copies/mL, sample # 1315602 about 4×10^5 genome

copies/mL and sample # 1315603 about 3×10^4 genome copies/mL of *Pneumocystis jirovecii*. Sample # 1315604 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells.

Fortunately, the promising results of the November 2012 external quality assessment scheme could also be confirmed in the current distribution. Samples # 1315601, which contained a relatively large amount of *P. jirovecii* target organisms ($\sim 3 \times 10^5$ genome copies per mL) and # 1315602 which contained an approximately ten-fold lower amount of *P. jirovecii*, were reported “positive” by all of the 66 participating laboratories. Even for the sample # 1315603, containing relatively low amounts of target organisms, 65 correctly positive results were reported by the 66 participants. Only one participant reported a false-negative result, which occurred probably due to the use of an *in house* NAT-based test system showing insufficient analytical sensitivity.

No false-positive results were observed for sample # 1315604, which contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. To sum up, the result constellation of the present *P. jirovecii* distribution indicates an excellent performance of the currently employed PCR/NAT-based assay concepts as well as laboratory-specific precautions for the prevention of contamination events.

The relatively small numbers of participants with RV 542, RV 543 and RV 560 still not allows a serious comparison between certain commercial tests, prefabricated kits and the very heterogeneous group of in house PCR/NAT assay concepts regarding analytical sensitivity, analytical specificity, susceptibility to contamination, or simply the “overall performance”.

Attachments

Available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2013-4/lab000010.shtml>

1. Anhang 1_lab000010.pdf (341 KB)
Results of the proficiency testing scheme “Bacterial and Fungal Genome Detection (PCR/NAT)” 2013

References

1. Köck R, Schaumburg F, Mellmann A, Köksal M, Jurke A, Becker K, Friedrich AW. Livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as causes of human infection and colonization in Germany. *PLoS One*. 2013;8(2):e55040. DOI: 10.1371/journal.pone.0055040
2. Köck R, Harlizius J, Bressan N, Laerberg R, Wieler LH, Witte W, Deurenberg RH, Voss A, Becker K, Friedrich AW. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2009 Nov;28(11):1375-82. DOI: 10.1007/s10096-009-0795-4

3. Reischl U, Frick J, Hoermansdorfer S, Melzl H, Bollwein M, Linde HJ, Becker K, Köck R, Tuschak C, Busch U, Sing A. Single-nucleotide polymorphism in the SCCmec-orfX junction distinguishes between livestock-associated MRSA CC398 and human epidemic MRSA strains. *Euro Surveill*. 2009 Dec 10;14(49):pii=19436
4. 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
5. 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
6. 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
7. Dumke R, Jacobs E. Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J Clin Microbiol*. 2009 Feb;47: 441-4. DOI: 10.1128/JCM.01989-08

Corresponding author:

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

Please cite as

Reischl U, Straube E, Maaß M, Jacobs E, Schneider W, Fingerle V, Busch U, Frangoulidis D, Splettstösser W, Grass G, Reiter-Owona I. Bakterien- und Pilzgenom-Nachweis PCR/NAT: Auswertung des Ringversuchs Mai 2013 von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *GMS Z Forder Qualitatssich Med Lab*. 2013;4:Doc03. DOI: 10.3205/lab000010, URN: urn:nbn:de:0183-lab0000102

This article is freely available from

<http://www.egms.de/en/journals/lab/2013-4/lab000010.shtml>

Published: 2013-07-22

Copyright

©2013 Reischl et al. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/deed.en>). You are free: to Share – to copy, distribute and transmit the work, provided the original author and source are credited.