



**INSTAND e.V.**  
**Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
in medizinischen Laboratorien e. V.**  
(vormals Hämometerprüfstelle)



Akkreditiert durch  
Zentralstelle der Länder  
für Gesundheitsschutz  
bei Arzneimitteln  
und Medizinprodukten  
ZLG-P-348.08.12



WHO Collaborating Centre for Quality Assurance  
and Standardization in Laboratory Medicine

in Zusammenarbeit mit der  
Deutschen Gesellschaft für  
Hygiene und Mikrobiologie (DGHM)

**INSTAND-Geschäftsstelle**

Ublerstr. 20  
40223 Düsseldorf  
Telefon: +49 (0)211 1592 13 0  
Fax: +49 (0)211 1592 1330  
E-mail: [instand@instand-ev.de](mailto:instand@instand-ev.de)  
Internet: [www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)

**Ringversuchsleiter:**

Prof. Dr. Udo Reischl  
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
Universitätsklinikum Regensburg (UKR)  
Franz-Josef-Strauss Allee 11  
93053 REGENSBURG  
Tel.: +49-(0)941-944-6450  
Email: [udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de](mailto:udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de)



Regensburg, den 23. Mai 2011

**RINGVERSUCHSAUSWERTUNG April 2011**

**An die Teilnehmer**

**der INSTAND e.V. -Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT**  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 543)

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-27 of this document. As always, result tables are depicted in a bilingual style.*

**Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,**

Sie erhalten hiermit die Auswertung des aktuellen INSTAND-Ringversuchs zum Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Ihre individuellen Resultate und deren Bewertung können Sie in gewohnter Weise der beigegeführten Teilnahmebescheinigung entnehmen.

Falls Sie an einer etwas umfangreicheren Diskussion unserer Ringversuchsaktivitäten im Bereich "Bakteriengenom-Nachweis" und näheren Informationen zur Konzeption der Ringversuchsproben interessiert sein sollten, sei hier auf die regelmäßigen Veröffentlichungen der Zeitschrift "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: BÄMI, Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) verwiesen.

Im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms und der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Im voraus vielen Dank für Ihren Kommentar !

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**Prof. Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider,  
Dr. V. Fingerle, Dr. U. Busch, Dr. D. Frangoulidis und PD Dr. W. Splettstösser**

**Adresse:** Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, D-93053 REGENSBURG  
**Telefon:** +49-(0)941-944-6450 **Fax:** -6451 **mail:** [udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de](mailto:udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de) **Inet:** [www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 14 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „highlights“: so wurden beispielsweise in zwei der 4 Einzelproben des **RV 530** bestimmte **Neisseria-Spezies** ausgesandt, die bekanntermaßen mit einigen Gonokokken-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagieren können - und dies in gewissem Umfang auch taten (s.u.). Nach der erfolgreichen Konfektionierung und Herstellung von zwei Proberingversuchen für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* (**RV 542**) und *Francisella tularensis* (**RV 543**) wurden mit der aktuellen Ringversuchsrunde nun auch diese beiden neu dazugekommenen erregerspezifischen Ringversuche in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

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

### APRIL 2011:

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 # 1115303, sowie die positive Proben des RV 531 # 1115314, und 1115311), *Helicobacter pylori* (Probe # 1115331), *Borrelia afzelii* (Probe # 1115354), *Legionella pneumophila* (Probe # 1115361), *Listeria monocytogenes* (Probe # 1115382), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1115403), *Mycoplasma pneumoniae* (Proben # 1115413, und # 1115415), *Francisella tularensis* (Probe # 1115433), sowie *Coxiella burnetii* (Probe # 1115423). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen an potentiell mit Gonokokken-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagierenden *Neisseria*-Spezies in den Proben # 1115301 (*N. meningitidis*) und # 1115304 (*N. cinerea*). 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. Tabelle 1 zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in Tabelle 3 nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualem 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: "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instandev.de](http://www.instandev.de)) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich, mit Ausnahme eines interessanten Einzelaspekts, weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis* und Gonokokken-Nachweis. Trotz der relativ geringen Erregermenge in einer der vier positiven Proben und der Aussendung von zwei *Neisseria*-Spezies, die bekanntermaßen mit einigen Gonokokken-spezifischen Testsystemen kreuzreagieren können, 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 eine Probe mit relativ geringer Menge an *C. trachomatis* (#1115303,  $\sim 1 \times 10^3$  IFU/mL), eine Probe (#1115302) mit ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL an *N. gonorrhoeae* sowie zwei Proben mit nennenswerten Mengen an *Neisseria meningitidis* (# 1115301) und *Neisseria cinerea* (# 1115304).

Auch wenn die positive Probe #1115303 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis* Zielorganismen versetzt worden war, fanden sich unter den von insgesamt 141 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 5 falsch-positive und 2 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 # 111502 (*N. gonorrhoeae*; ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL) nur von 2 der insgesamt 141 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Angesichts der relativ hohen Menge an Zielorganismen in dieser Probe sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Bekanntermaßen weisen einige der kommerziellen NAT-gestützten Testsysteme zum spezifischen Direktnachweis von *N. gonorrhoeae* gewisse Limitationen hinsichtlich der analytischen Spezifität auf. Um diesen kritischen Aspekt im Rahmen von Ringversuchen (und dem damit verbundenen Auftrag zur Qualitätssicherung) näher zu untersuchen, enthielten bereits zwei der vier Einzelproben des vorhergegangenen Ringversuchs (November 2010) bestimmte *Neisseria*-Spezies, die erfahrungsgemäß mit einigen Gonokokken-spezifischen Testsystemen kreuzreagieren können. In dem Ringversuch wurde von einem Teilnehmer *N. sicca* als *N. gonorrhoeae* und von 10 Teilnehmern *N. lactamica* als *N. gonorrhoeae* falsch identifiziert. Da hierbei eine Zuordnung zu bestimmten Untersuchungsverfahren, Zielgenen oder bestimmten kommerziellen Testsystemen nicht auffällig war, kann möglicherweise von einer mangelhaften Durchführung der Untersuchung in einzelnen Laboratorien ausgegangen werden. Als Fortführung dieser Spezifitätsabprüfung waren in der aktuellen Aussendung wieder zwei Proben mit nennenswerten Mengen an *Neisseria meningitidis* (# 1115301) und *Neisseria cinerea* (# 1115304) versehen worden. Die entsprechenden *Neisseria*-Spezies wurden u.a. von Herrn Prof. Dr. Magnus Unemo (National Reference Laboratory for Pathogenic *Neisseria*, Department of Clinical Microbiology, Örebro University Hospital, Örebro, Schweden) zur Verfügung gestellt und vor der Aussendung phänotypisch und genotypisch in zwei unabhängigen Laboratorien bestätigt. Zur Prävalenz von *N. cinerea* sei exemplarisch auf die Arbeit von Knapp and Hook (Journal of Clinical Microbiology, 1988, **26**:896-900) verwiesen.

In diesem Ringversuch wurde *N. meningitidis* 14-mal (~ 10 %) und *N. cinerea* 31-mal (~ 22 %) als *N. gonorrhoeae* falsch identifiziert. Anders als beim Ringversuch im November 2010 konnten die falsch positiven Befunde der NAT-gestützten Gonokokken-Nachweisverfahren bestimmten Verfahren oder Herstellern zugeordnet werden, wobei BD ProbeTec hier 7-mal *N. meningitidis* (~ 27 %) und 26-mal *N. cinerea* (100 %) als *N. gonorrhoeae* falsch identifiziert hat. Bei Nutzern anderer kommerzieller Verfahren und bei selbstentwickelten (*in house*) Verfahren traten diese Fehler bei bis zu 13 % der Ergebnisse auf. Die Verteilung falsch-positiver Gonokokken Befunde erfolgte hier aber eher sporadisch, und eine Häufung bei bestimmten Untersuchungsverfahren oder Zielgenen war dabei nicht erkennbar.

***Angesichts der wohl unumstrittenen Brisanz von falsch-positiven Gonokokken Befunden für die Betroffenen und möglichen forensischen Konsequenzen sollten Kolleginnen und Kollegen, die die hier auffälligen Testsysteme zum Direktnachweis von N. gonorrhoeae DNA aus klinischem Probenmaterial derzeit routinemäßig einsetzen, bis auf weiteres positive Ergebnisse mit einem unabhängigen Testsystem absichern. Den Herstellern von Testsystemen, wie auch den Nutzern von selbstentwickelten (in house) Verfahren, die hier zu fehlerhaften Ergebnissen geführt haben, wird empfohlen, die Spezifität ihrer Testsysteme zu überprüfen und notwendigenfalls zu verbessern. Zur Kontrolle der erfolgreichen Optimierung betroffener Testsysteme können in begrenztem Umfang Rückstellproben des aktuellen Ringversuchs oder neue Proben mit entsprechendem Inhalt über den Ringversuchsleiter angefordert werden (Udo Reischl, Eberhard Straube).***

Da das besagte Spezifitätsproblem jedoch nur auf einige wenige Testkonzepte, und hier nur auf die GO-spezifische Testkomponente beschränkt zu sein scheint, 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.

Die Ergebnislage bei den Testsystemen der Fa. Gen-Probe sollte jedoch differenziert betrachtet werden. Wie an dieser Stelle bereits mehrmals ausgeführt, handelt es sich hierbei um NAT-Testsysteme, die bekanntermaßen erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen und in der Praxis an nativem Probenmaterial gute Leistungsdaten aufweisen. 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 unter Einsatz der vorgeschriebenen Mengen des hier

versandten Probenmaterials offensichtlich keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Daher sind diese Testsysteme und die entsprechenden Richtigkeitsquoten in den Tabellen der statistischen Auswertung grau dargestellt. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch bei der aktuellen, aber auch bei vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Dies deutet, zumindest indirekt, auf ausreichend hohe Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin. 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.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 141 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nur von einem Teilnehmer bei zwei der vier Einzelproben auf dem Ergebnisbogen mitgeteilt. Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem BD ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, dass im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tabelle 3 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 detailliertere Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden diesmal zusätzlich die Tabellen 4, 5 und 6 angefertigt. In Tabelle 4 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in Tabelle 5 nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet. Tabelle 6 dient zur selektiven Darstellung der falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnisse nach mitgeteilter NAT-Methode oder kommerziellem Testsystem bei den Proben # 1115301 (*Neisseria meningitidis*) und # 1115304 (*Neisseria cinerea*).

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche Cobas 4800 System (7x), TibMolbiol LightMix NG (5x), Amplex Hyplex STD (3x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (2x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (2x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (2x), Minerva Biolabs Onar CT qPCR Kit (1x), Hain GenoQuick CT (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), und Euroclone Duplica Real Time *N. gonorrhoeae* Detection Kit (1x).

### **RV 531: *Chlamydia trachomatis***

Das aktuelle Ringversuchsset enthielt diesmal nur zwei identische Proben mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1115311, und # 1115314 mit  $10^3$  IFU/mL an *C. trachomatis*), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1115312, und # 1115313), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den beiden positiven Proben # 1115311 und # 1115314 lediglich von 6 der insgesamt 136 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bis auf 2 falsch-positive Ergebnisse (von 2 unterschiedlichen Teilnehmern) wurden diesmal bei den negativen Proben # 1115312 und # 1115313 durchwegs richtig negative Ergebnisse berichtet, und unter den insgesamt 544 mitgeteilten Ergebnissen wurde auch kein Ergebnis als "fraglich" oder von den Teilnehmern im Ergebnisbogen als "inhibiert" klassifiziert.

Diese 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  $1 \times 10^3$  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 falsch-negative Ergebnisse Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor aktuellen Diskussion um das "pooling" von entsprechendem Untersuchungsmaterial gewinnt auch der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme zusätzlich an Bedeutung.

Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden dabei nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, daß wir auch diesmal keine der Ringversuchsproben 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 (3x), Roche Cobas 4800 System (1x), Hain GenoQuick CT (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), und Medac Q PCR Alert AmpliMaster PCR Kit (1x).

### **RV 532: *Bordetella pertussis***

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt nur eine Probe mit relativ hoher Menge an *Bordetella pertussis* (# 1115323,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), und drei *Bordetella parapertussis* positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge (# 1115321;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1115322;  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml), und eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1115324;  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/ml).

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte diesmal sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten.

Bei der Auswertung des aktuellen Ringversuchs ergibt sich jedoch ein besonderer Aspekt aus dem Umstand, daß von der Fa. HAIN Lifescience kürzlich ein PCR-gestütztes Testsystem eingeführt wurde, das konzeptbedingt nicht zwischen dem Vorliegen von *B. pertussis* und/oder *B. parapertussis* DNA im untersuchten Probenmaterial differenziert. Eine fachliche Bewertung neuer Testkonzepte unter klinisch-diagnostischen sowie ökonomischen Gesichtspunkten soll und kann nicht Gegenstand dieser Ringversuchsauswertung sein. Tatsache ist jedoch, daß im Kommentarfeld des Ergebnisformulars von 11 Teilnehmern unter Code [27] explizit die Verwendung des HAIN GenoQuick Bordetella Kits angegeben wurde. Rechnet man die jeweils 9 falsch-positiven Ergebnisse bei den *B. parapertussis*-positiven Proben # 1115321, # 1115322 und # 1115324 zu, verbleiben immer noch 2 Teilnehmer mit HAIN GenoQuick Bordetella Kit, die diese *B. parapertussis*-positiven Proben "falsch-negativ" getestet haben bzw. hätten (?). Zur Ehrenrettung einzelner Teilnehmer sei hier jedoch auch angeführt, daß die Ermittlung der Ringversuchsergebnisse prinzipiell auch unter Zusammenschau der Ergebnisse mehrerer unterschiedlicher Untersuchungsverfahren möglich ist...

Auch wenn diese rätselhafte Ergebniskonstellation des aktuellen Ringversuchs aus formeller Sicht (zumindest für den Ringversuchsleiter) nicht lösbar sein wird, gibt es für zukünftige *B. pertussis* Ringversuche die Information, daß von der Fa. HAIN Lifescience in absehbarer Zeit ein weiterer Test zur Speziesdifferenzierung bei positivem *Bordetella* spp. PCR Befund verfügbar sein wird.

Angesichts der zufriedenstellend hohen Richtigkeitsquote für die *B. pertussis*-positive Probe # 1115323 und der übrigen drei *B. pertussis*-negativen Proben hat sich der Ringversuchsleiter (auch nach Rücksprache mit Herrn Professor Wirsing von König, dem Leiter des Konsiliarlabors für

*Bordetella pertussis*), dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. parapertussis* unter den Anwendern des besagten Testsystems von HAIN Lifescience nicht als falsch-negativ zu bewerten.

Die 6 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei der *B. pertussis*-positive Probe # 1115323 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die analytische Sensitivität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

Inhibitionskontrollen wurden von 125 der insgesamt 127 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei dem aktuellen Probenstet von keinem Teilnehmer beobachtet.

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 59 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz *IS481* und von 4 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN GenoQuick Bordetella (11x), Autoimmun Diagnostika CAP *B. pertussis* (10x), TibMolbiol LightMix BP (9x), *B. pertussis* / *B. parapertussis* von Cepheid (1x), Ingenetix Bacto Real Bordetella (1x), Mikrogen Diagenode *B. pertussis* / *B. parapertussis* kit (1x), und Attomol *Bordetella* DNA-LINA (2x).

### **RV 533: *Helicobacter pylori***

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben eines Clarithromycin-empfindlichen *H. pylori* Patientenisolats in einer Art Verdünnungsreihe. Eine der Proben enthielt relativ hohe Mengen an Zielorganismen (# 1115332; *H. pylori*,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), eine etwa zehnfach geringere Menge (#1115333; *H. pylori*,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml), eine etwa hundertfach geringere Menge (#1115331; *H. pylori*,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/ml), und eine der 4 Proben enthielt keine Zielorganismen (# 1115334), sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden positiven Proben # 1115332 ( $\sim 10^5$  CFU/ml an *H. pylori*) und # 1115333 ( $\sim 10^4$  CFU/ml) führte beim Nachweis von *H. pylori* DNA zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von einem der insgesamt 44 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die positive Probe # 1115333 und von 9 weiteren Teilnehmern ein falsch-negatives Ergebnis für die schwach-positive Probe #1115331 ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/ml) mitgeteilt.

Falsch-positive Ergebnisse für die Probe ohne Zielorganismen (# 1115334) wurden von keinem der 44 Teilnehmer beobachtet. Auch diesmal schnitten sowohl die kommerziellen als auch die eigenentwickelten Testsysteme wieder erfreulich gut ab. Bis auf 14 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" 9 x GenoType Helico Kit von HAIN Lifescience und 1 x Diarella *Helicobacter* von Gerbion angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei 43 der 44 Teilnehmer beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitionskontrolle, und von keinem der Teilnehmer wurden in den Einzelproben des Ringversuchs Inhibitionsereignisse 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 29 der insgesamt 44 Teilnehmer mitgeteilt, und diese waren mit Ausnahme von zwei Teilnehmern (die die *H. pylori* Zielorganismen in der Probe # 1115332 als Clarithromycin-resistent bewertet hatten) durchwegs 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 eine einzige positive Probe mit ca.  $1 \times 10^5$  CFU/ml (# 1115344: *E. coli*, *stx*<sub>1</sub>-positiv, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv), eine Probe mit einer relativ geringen Menge eines klinischen EPEC Isolats (# 1115343; *eae*-positiv), eine Probe mit nennenswerten Mengen an Yersinien (# 1115342), sowie eine Probe mit einem *E. coli* K12 Stamm # 1115341; *eae*-, *hlyA*- negativ).

Abgesehen von der EPEC Probe (# 1115343) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten - sowohl für positive als auch für negative Befunde. Für die 10 falsch-positiven PCR Resultate für Probe # 1115343 gibt es keine naheliegenden Erklärungen - eventuell könnte man hier über eine fälschliche Klassifizierung des *eae*-Gens als Surrogatmarker für EHEC oder das Auftreten von Kontaminationsereignissen durch die benachbarte EHEC-positive Probe während der Probenaufreinigung und Prozessierung der PCR-Reaktionsansätze spekulieren. Interessanterweise waren von den falsch-positiven EHEC Ergebnissen bei Probe # 1115343 vorwiegend Anwender der beiden kommerziellen Testsysteme (GenoType EHEC mit 4 von 17 Teilnehmern und Hyplex EHEC mit 3 von 5 Teilnehmern) betroffen.

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. Die Mehrzahl der Teilnehmer gab die Verwendung von selbstentwickelten oder "anderen" 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 71 der insgesamt 80 Teilnehmer die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde und bei einigen Teilnehmern mit den jeweils eingesetzten molekularbiologischen Testsystemen kein Ergebnis bei der schwach konzentrierten Probe # 1115343 erhalten werden konnte, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, durchwegs korrekt.

Falls Sie das aktuelle EHEC-Ausbruchsgeschehen in Norddeutschland verfolgen und selber für die Testung von Primärkulturen vorbereitet sein wollen, so findet sich für den gezielten Nachweis von *stx*-Genen, *eae* sowie *hlyA* ein gut evaluiertes und robustes real-time PCR Protokoll beispielsweise unter: J. Clin. Microbiol. (2002) **40**:2555–2565.

### **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 stricto Genotypen, die, zumindest in Zentraleuropa, 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.

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Abprüfung der analytischen Sensitivität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt somit eine Probe mit einer hoher Menge an *Borrelia afzelii* PKo (# 1115351,  $\sim 1 \times 10^6$  Organismen/mL), eine Probe mit etwas geringerer Menge (# 1115353,  $\sim 1 \times 10^4$  Organismen/mL), eine Probe mit relativ geringer Menge (# 1115354,  $\sim 1 \times 10^3$  Organismen/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen, die eine relativ hohe Menge an *Leptospira interrogans* enthielt (# 1115352,  $\sim 1 \times 10^5$  Organismen/mL).

Die relativ stark positive Probe # 1115351 wurde diesmal von allen der insgesamt 119 Teilnehmer als positiv befundet. Probe # 1115353 enthielt mit ca.  $10^4$  Organismen pro mL eine etwa hundertfach geringere Menge an *B. afzelii*, deren DNA immerhin noch von 116 Teilnehmern mit ihren jeweiligen Borrelien-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte.

Einer der 3 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1115353 gab dabei die Verwendung eines TaqMan *real-time* PCR Protokolls mit dem Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz an, von einem weiteren Teilnehmer wurde hier die Verwendung eines *nested* Block-Cycler PCR-Protokolls zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte angeführt. Mit ca.  $10^3$  *B. afzelii* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1115354 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 106 der insgesamt 119 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ähnlich wie bei der Probe mit ca.  $10^3$  Organismen/mL an *B. afzelii* (RV 535, Mai 2009; von 92 von 101 Teilnehmern richtig-positiv getestet) sowie der Probe mit ca.  $10^3$  Organismen/mL an *B. burgdorferi* sensu stricto (RV 535 November 2009; von 69 von 101 Teilnehmern richtig-positiv getestet) und einer der 4 Proben mit ca.  $10^3$  Organismen/mL an *B. afzelii* im Ringversuch April 2008 (von 87 von 97 Teilnehmern richtig-positiv getestet), kann die Ergebniskonstellation mit dieser gering konzentrierten Probe als 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 Borrelien DNA mit einer Menge von ca.  $10^3$  Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei einer DNA-Aufreinigung aus 100 µl Probenmaterial, einer Elution in 100 µl (also ca. 100 Genomkopien in 100 µl) und der Verwendung von 5 µl 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 5 bis 10 Kopien pro Bakteriengenom vor).

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1115354 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Ringversuchsteilnehmer, die diese Probe als "negativ" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlaß nehmen, die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen Testsysteme zu überprüfen oder sich gegebenenfalls deren technische Limitationen bewußt machen.

Die "negative" Probe # 1115352, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *Leptospira interrogans* enthielt, wurde hier auch wieder von einem erfreulich hohen Anteil der Teilnehmer als negativ befundet. Lediglich bei einem der insgesamt 119 Teilnehmer hatten hier offensichtlich Kontaminationsereignisse während der individuellen Probenaufarbeitung stattgefunden oder es wurden Testsysteme mit mangelhafter Spezifität eingesetzt.

Nach wie vor haben über die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; signifikante Inhibitionsergebnisse der PCR-Reaktion wurde im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem der Teilnehmer beobachtet. Im Großen und Ganzen waren im

Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen zu beobachten. Die in zunehmendem Maße von den Teilnehmern eingesetzten kommerziellen Testsysteme "RealArt Borrelia" Testsystem, das mittlerweile mit dem Testcode [20] auf dem Ergebnisformular spezifiziert werden kann und das Demeditec GenFlow Testsystem (Code [21]) zeigen bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse (Tabelle 3) eine gute Performance.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix Borrelia (6x), Qiagen artus Borrelia LC PCR Kit (4x), EliGene *Borrelia* LC 2 von Elisabeth Pharmacon (3x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (3x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (2x), Demeditec GenFlow Borrelia Plus (1x), Immundiagnostik MutaGEL *Borrelia* (1x), Zecken Screening Kit von Autoimmun Diagnostika (1x), ixSave *Borrelia* LC und ixSave *Borrelia* TM von Gerbion (1x), und Ingenetix *Borrelia burgdorferi sensu latu sp.* Assay (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 erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von *L. pneumophila* DNA etabliert haben oder solche im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1115364; *L. pneumophila* Serogruppe 1,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1115362; *L. pneumophila* Serogruppe 1,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1115361; *L. pneumophila* Serogruppe 1,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1115363), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Die relativ stark positive Probe # 1115364 wurde diesmal von nahezu allen der insgesamt 94 Teilnehmer als positiv befundet. Probe # 1115362 enthielt mit ca.  $10^4$  Organismen pro mL eine etwa zehnfach geringere Menge an *L. pneumophila* SG 1, deren DNA immerhin noch von 78 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *L. pneumophila*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Drei der 15 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1115362 gaben die Verwendung eines TaqMan *real-time* PCR Protokolls mit dem *omp*-Gen als spezifische Zielsequenz an, einer der Teilnehmer mit *in house* Protokoll die Verwendung des *mip*-Gens, und von einem der 15 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1115362 wurde hier die Verwendung eines *nested* Block-Cycler PCR-Protokolls zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte angeführt.

Mit ca.  $10^3$  *L. pneumophila* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1115361 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 53 der insgesamt 94 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ähnlich wie bei der Probe mit ca.  $10^3$  CFU/mL an *L. pneumophila* (RV 536, April 2010; bei 50 von 77 Teilnehmern richtig-positiv getestet) sowie der Probe mit ca.  $10^4$  CFU/mL (RV 536, April 2010; bei 68 von 77 Teilnehmern richtig-positiv getestet), weist die aktuelle Ergebniskonstellation erneut darauf hin, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch gut evaluierten NAT-

gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA mit einer Menge von ca.  $10^3$  Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1115361 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Ringversuchsteilnehmer, die auch die Probe # 1115362 (mit ca.  $10^4$  Legionellen pro mL) als "negativ" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlaß nehmen, die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen Testsysteme zu überprüfen oder sich gegebenenfalls deren technische Limitationen bewußt machen.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 38 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Ein Teilnehmer gab hier die Verwendung des neuen BD ProbeTec *Legionella* Testsystems an (Code [26] auf dem Ergebnisformular). Leider wurden nicht von allen der restlichen Teilnehmer die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen durchgehend spezifiziert. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (6x), TibMolbiol LightMix *Legionella* (5x), LEGD-LC von PIIM (3x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (3x), Qiagen Artus *L. pneumophila* LC PCR Kit (3x), Ingenetix Bact real *L. pneumophila* RT PCR Assay (1x), Argene Chlamylege (1x), Nanogen PNEUMOTRIS oligomix Alert Kit (1x), und GeneProof LP PCR detection Kit (1x). Interessanterweise wurde von allen 6 Teilnehmern, die die Verwendung des kommerziellen Gen ID CAP Bac Kits angaben, die schwach positive Probe # 1115361 als *L. pneumophila*-negativ befundet. Von den anderen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet, und von keinem der insgesamt 94 Teilnehmer wurde bei dem aktuell versandten Probenstet ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

### **RV 537: *Salmonella enterica***

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1115372; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/mL), eine Probe mit einer etwa zehnfach geringeren Menge (# 1115374; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL), eine Probe zur Abprüfung der analytischen Spezifität (# 1115373, *Yersinia spp.*) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1115371), 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. Im Gegensatz zu manch früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen war diesmal kein falsch-positives Ergebnis bei der "negativen Probe" bzw. eine Kreuzreaktion der eingesetzten Testsysteme mit der Yersinie in Probe # 1115373 zu beobachten. Dies deutet 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 keine falsch-positiven Befunde und auch keine falsch-negativen Befunde mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit bei 100 %. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: Sure Food Pathogen - *Salmonella* Plus Kit der Fa. Congen (1x).

In enger Abstimmung mit unserem Sollwert-Laboratorium (Frau Dr. Ute Messelhäuser, Bayerisches 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 genauen 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. Im aktuellen Ringversuch wollten wir uns jedoch auf die Abprüfung der analytischen Sensitivität konzentrieren und es wurde eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt. Probe # 1115383 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), die auch von 28 der insgesamt 30 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1115381 enthielt mit  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich einer der 30 Teilnehmer berichtete hier ein (falsch-) negatives Ergebnis - vermutlich wurde hier ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt. Mit ca.  $5 \times 10^2$  *L. monocytogenes* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1115382 diesmal eine sehr geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde selbst diese schwach-positive Probe von 29 der insgesamt 30 Teilnehmer als "positiv" klassifiziert. Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1115384), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, 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 "diagnostisch Sinnvollen" ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte. Der möglichst selektiven Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-monocytogenes Listerienspezies werden wir uns wieder in einigen der zukünftigen Ringversuchsrunden widmen.

Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch auch wieder standardisierter Rückstellproben mit geringerer Menge an Zielorganismen zur Verfügung, die als untere Meßplatte bezüglich der analytischen Sensitivität dienen können und direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

Von allen 30 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix *L. monocytogenes* (2x), und DYNEX Real Time PCR Kit *Listeria* (1x).

Bei diesem Ringversuch besteht 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.

## 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 keine "schwierigen" oder komplexen Probenkonstellationen (die jedoch in der täglichen Praxis bekanntermaßen durchaus vorkommen können) versandt haben, wurden von den insgesamt 208 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchgehend korrekte PCR Ergebnisse für die 4 Proben des aktuellen Panels berichtet.

Wie in Tabelle 1 der statistischen Auswertung dargestellt, enthielten die Proben # 1115392 und # 1115393 eine relativ hohe Menge eines typischen cMRSA Isolats (MRSA; PVL-positiv;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml). Probe # 1115394 enthielt eine Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml). Die letzte der 4 Proben (# 1115391), enthielt neben humanem Zellmaterial nur eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise (und diesmal auch "erwartungsgemäß") wurden für die beiden MRSA-positiven Proben # 1115392 und # 1115393 von nahezu allen Teilnehmern positive Ergebnisse mitgeteilt. Lediglich ein Teilnehmer hatte sein Ergebnis bei Probe # 1115392 als "fraglich" klassifiziert. Auch die beiden MRSA-negativen Proben # 1115391 und # 1115394 wurden von jeweils 206 bzw. 202 Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten MRSA-spezifischen Testsystemen als "negativ" getestet. Für die 2 falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 1115391 (*E. coli*) hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Die 4 falsch-positiven und die 2 von den Teilnehmern als "fraglich" klassifizierten Ergebnisse bei Probe # 1115394 (*mecA*-positiver *S. epidermidis*) könnten eventuell mit sporadischen Kontaminationsereignissen während der Probenisolierung und -prozessierung zusammenhängen. Betrachtet man die testspezifische Aufschlüsselung der Richtigkeitsquoten in Tabelle 3, so sind diese falsch-positiven Ergebnisse schwerpunktmäßig bei Teilnehmern aufgetreten, die die Verwendung von eigenentwickelten (*in house*) Testsystemen aufgeführt haben. 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-negativen Befunden bei den MRSA-negativen Proben erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 52 der insgesamt 208 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt, und diesmal waren die 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: Linde, H.J. und N. Lehn (2005) Dtsch. Med. Wochenschr. 130:2397-2401, oder Witte, W. et al. (2005) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24:1-5. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus* Isolaten findet sich beispielsweise in: Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. (2007) **26**:131-135.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix (3x), Gen ID MRSA Kit (1x), MRSA Plus der Fa. Congen (1x), und HAIN Genotype *Staphylococcus* (2x).

### **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.

**Aktueller Hinweis von Herrn Professor Dr. Matthias Maaß** (Leiter des Universitätsinstituts für Medizinische Mikrobiologie, Hygiene und Infektiologie der PMU, SALK Labor GmbH, Universitätsklinikum Salzburg; Sollwertlabor für INSTAND e.V. bei Ringversuch RV 540) **auf eine neue Entwicklung in der Chlamydien-Taxonomie:** Mit Erscheinen der zweiten Auflage von Bergey's Manual of Systematic Bacteriology wird nur noch ein Genus (*Chlamydia*) in der Familie *Chlamydiaceae* als valide angesehen. Das zwischenzeitlich propagierte Genus "*Chlamydophila*" wurde fallen gelassen. Grund sind kritische Auswertungen der 16S rRNA Gen-Sequenzen und das taxonomische Ziel, die Nomenklatur stabil zu halten (Ref.: 1. Kuo CC, Stephens RS, Bavoil P, Kaltenboeck B. Genus I. Chlamydia Jones Rake and Steams 1945,55AL. In: Krieg NR et al. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Four. Springer, New York, NY, 2nd ed. 2011: 846-865).

Aber nun zurück zur eigentlichen Ringversuchsauswertung. Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal je zwei Proben mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1115402; *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml und # 1115403; *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^3$  IFU/ml), eine Probe mit *Haemophilus influenzae* (# 1115404), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1115401), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie auch schon in 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 Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tabelle 2 aufgeführten Daten ist zu entnehmen, daß auch nahezu alle Teilnehmer die Zielorganismen in den beiden positiven Proben # 1115402 und # 1115403 sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Erfreulicherweise wurde für die Probe # 1115404 (*Haemophilus influenzae*) lediglich von einem der insgesamt 108 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis berichtet. Bei der negativen Probe # 1115401 wurden auch diesmal wieder von allen 108 Teilnehmern durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Alle Teilnehmer haben 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 11 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems angegeben (Code [21] auf dem Ergebnisformular) und sie konnten damit eine Richtigkeitsquote 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: Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (6x), BD Probe Tec *Chlamydia* spp. (3x), Vircell Speed-Oligo (2x), CHLPN-LC von PIIM (2x), GenProof *C. pneumoniae* PCR Kit (1x), Immundiagnostik MutaPLATE *C. pneumoniae* (1x), Nanogen PNEUMOTRIS oligomix Alert Kit und CHLAMYDOPHILA pn. Q-PCR Alert Kit (1x), Diagenode *Mycoplasma/Chlamydophila pneumoniae* Real Time PCR (1x), Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x), Bacto real *C. pneumoniae* RT PCR Assay der Fa. Ingenetix (1x), *Mycoplasma/Chlamydophila pneumoniae* PCR der Fa. Mikrogen (1x) und Argene Chlamylege (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. Im Rahmen dieses Ringversuchs wurden diesmal zwei Gruppen von unterschiedlichen Probensets versandt (**Gruppe 1:** Probennummern # 1115411 bis # 1115414; **Gruppe 2:** Probennummern # 1115415 bis # 1115418).

Diese beiden Sets an Ringversuchsproben enthielten in ähnlicher Zusammenstellung jeweils drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe: jeweils eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1115411;  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL für Gruppe 1; # 1115416;  $\sim 1 \times 10^6$  Genomkopien/mL für Gruppe 2), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1115414;  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL für Gruppe 1; # 1115418;  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL für Gruppe 2), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1115413;  $\sim 1 \times 10^3$  Genomkopien/mL für Gruppe 1; # 1115415;  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL für Gruppe 2), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1115412 für Gruppe 1; # 1115417 für Gruppe 2), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen und probenmaterialähnlichen Proteinkomponenten enthielt.

Insgesamt betrachtet wurden im Rahmen der aktuellen Probensets von den Teilnehmern wieder relativ hohe Richtigkeitsquoten erzielt. So konnten innerhalb der Gruppe 1 diesmal 104 der insgesamt 105 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae* Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1115416 problemlos und zuverlässig nachweisen. Mit Ausnahme von 8 Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis und 2 Teilnehmern, die ihr Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert haben, wurden von teilnehmenden Laboratorien auch für die etwas schwächer positive Probe # 1115414 ( $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL) durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet. Bei der schwach positiven Probe # 1115413 mit ca.  $10^3$  Genomkopien/mL konnten diesmal nur noch von 68 der insgesamt 105 Teilnehmer positive Ergebnisse ihrer *M. pneumoniae*-spezifischen Testsysteme beobachtet werden. Ähnlich wie bei einigen der vorangegangenen Ringversuche kann die Ergebniskonstellation mit dieser gering konzentrierten Probe als Hinweis darauf angesehen werden, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr

gut evaluierten NAT-gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA mit einer Menge von ca.  $10^3$  Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint.

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1115413 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Die "negative" Probe # 1115412, die anstelle der Zielorganismen diesmal lediglich *E. coli* enthielt, wurde nahezu von allen Teilnehmern als negativ befundet. Lediglich zwei der insgesamt 105 Teilnehmer hatten ihr Ergebnis hier als „fraglich“ klassifiziert.

Gruppe 2 enthielt diesmal ein vergleichbares Set aus 3 positiven und einer negativen Probe, wobei jedoch die positiven Proben die entsprechenden Zielorganismen in ca. 10-fach höherer Menge enthielten. Auch wenn dieses Probenset nur an 7 zufällig ausgewählte Teilnehmer versandt wurde, so ist die Ergebniskonstellation hier eindeutig und bedarf wohl keiner weiteren Diskussion. Alle positiven und alle negativen Proben wurden von allen Teilnehmern korrekt befundet.

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: Dumke, R. und E. Jacobs (2009) Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 47: 441-444. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 5 Teilnehmern die Verwendung des Qiagen *M. pneumoniae* Testsystems angegeben (Code [21] auf dem Ergebnisformular) und sie konnten damit eine Richtigkeitsquote 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: CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (4x), MYPD-LC von PIIM (4x), BD Probe Tec *M. pneumoniae* (3x), Vircell Speed-Oligo (1x), Nanogen/Medac Q-PCR Alert Kit (1x), Nanogen PNEUMOTRIS oligomix Alert Kit (1x), Diagenode *Mycoplasma/Chlamydia pneumoniae* Real Time PCR (1x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (1x), Argene Chlamydege (1x), Bacto real *M. pneumoniae* RT PCR Assay der Fa. Ingenetix (1x), *M. /C. pneumoniae* PCR der Fa. Mikrogen (1x), und Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x).

### **RV 542: *Coxiella burnetii***

Dieser neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Coxiella burnetii* 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. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe: eine Probe mit sehr hoher Menge an Zielorganismen (# 1115421; *Coxiella burnetii*,  $\sim 1 \times 10^6$  Genomkopien/mL), eine mit etwa tausendfach geringerer Menge (# 1115422; *C. burnetii*,  $\sim 1 \times 10^3$  Genomkopien/mL), eine mit relativ niedriger Menge (# 1115423; *C. burnetii*,  $\sim 1 \times 10^2$  Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1115424), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Die relativ stark positive Probe # 1115421 wurde diesmal von allen der insgesamt 16 Teilnehmer als positiv befundet. Probe # 1115422 enthielt mit ca.  $10^3$  Organismen pro mL eine etwa tausendfach geringere Menge an *C. burnetii*, deren DNA immerhin noch von 14 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte.



Die beiden Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1115422 gaben dabei die Verwendung eines eigenentwickelten (*in-house*) PCR assays; bei einem der Teilnehmer war explizit das "Transposase Gen (IS1111)" als Zielsequenz vermerkt.

Mit ca.  $10^2$  *C. burnetii* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1115423 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 8 der insgesamt 16 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Auch wenn die Anzahl der teilnehmenden Laboratorien bei der aktuellen Ringversuchsrunde noch nicht sehr hoch ist, so kann die Ergebniskonstellation bei dieser gering konzentrierten Probe 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 *C. burnetii* DNA mit einer Menge von ca.  $10^3$  Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint.

**Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei einer DNA-Aufreinigung aus 100 µl Probenmaterial, einer Elution in 100 µl (also ca. 100 Genomkopien in 100 µl) und der Verwendung von 5 µl 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 5 bis 10 Kopien pro Bakteriengenom vor, bei der IS1111-Zielsequenz handelt es sich um ein *multicopy target*, bei der COM-1 Zielsequenz dagegen nur um ein sog. *single copy target*).

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1115423 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Vor allem diejenigen Ringversuchsteilnehmer, die Probe # 1115422 als "negativ" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlaß nehmen, die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen Testsysteme zu überprüfen, deren technische Limitationen bewußt machen und gegebenenfalls nachbessern. Die "negative" Probe # 1115424, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde von allen 16 Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet.

### **RV 543: *Francisella tularensis***

Dieser 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 werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe (siehe Tabelle 1): eine Probe mit sehr hoher Menge an Zielorganismen (# 1115431; *Francisella tularensis holarctica*,  $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1115432; *F. tularensis holarctica*,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), eine mit etwa tausendfach geringerer Menge (# 1115433; *F. tularensis holarctica*,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1115434), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Ähnlich wie bei dem zuvor diskutierten Coxiellen-Ringversuch haben auch hier alle der 7 Teilnehmer die relativ stark positive Probe 1115431 als positiv befundet. Probe # 1115432 enthielt mit ca.  $10^4$  Organismen pro mL eine etwa hundertfach geringere Menge an *F. tularensis*, deren DNA immerhin noch von 3 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *F. tularensis*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte.

Zwei der 4 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1115422 gaben dabei die Verwendung eines eigenentwickelten (*in-house*) PCR assays mit ribosomalem Gen als Zielsequenz an, von einem Teilnehmer wurde die Verwendung des *tul4/lpnA* Gens als Zielsequenz

seines Testkonzepts aufgeführt. Eine ähnliche Ergebniskonstellation ist bei der Probe # 1115433 mit ca.  $10^3$  CFU/mL an *F. tularensis* zu beobachten. Auch hier lag bei 2 der 7 Teilnehmer die Erregermenge in dem Probenmaterial vermutlich unter der Nachweisgrenze ihrer eingesetzten NAT-gestützten Testsysteme. Aufgrund der noch relativ geringen Teilnehmerzahl sollte hier auch keine statistische Aufarbeitung der Ergebnisse versucht werden. Die zukünftigen Ringversuchsrunden werden zeigen, inwieweit sich spezielle Zielsequenzen oder bestimmte kommerzielle oder eigenentwickelte Testsysteme als Favoriten darstellen.

Die "negative" Probe # 1115434, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde von allen 7 Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet. Dies spricht zumindest für ein gutes Funktionieren der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Auch wenn die Anzahl der teilnehmenden Laboratorien bei der aktuellen Ringversuchsrunde noch nicht sehr hoch ist, so kann auch hier die Ergebniskonstellation bei den beiden geringer konzentrierten Proben als orientierender Hinweis darauf angesehen werden, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *F. tularensis* DNA mit einer Menge von ca.  $10^3$  Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint.

**Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei einer DNA-Aufreinigung aus 100 µl Probenmaterial, einer Elution in 100 µl (also ca. 100 Genomkopien in 100 µl) und der Verwendung von 5 µl 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 5 bis 10 Kopien pro Bakteriengenom vor und bei den unterschiedlichen erregerspezifischen Zielsequenzen muß zwischen sog. *multicopy* und *single-copy targets* differenziert werden).

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in den Proben # 1115422 und # 1115423 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet.

Aufgrund der noch relativ geringen Teilnehmerzahl bei RV 542 und RV 543 und 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.

May , 2011

**To the participants of the  
INSTAND e.V. external quality assessment scheme (EQAS)  
for NAATs in Diagnostic Bacteriology  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 543)**

**Dear Participant, dear Colleague,**

Please find enclosed a brief analysis report of the recent proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)". It summarizes some benchmarks and the overall assessment of results reported by all of the the participating laboratories.

The accuracy of your individual results is indicated on your personal certificate issued by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany (attached to this letter).

This highly desired sheme for external quality assessment (EQAS) was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. As you can learn from "[www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)", this new segment of their huge proficiency testing program is now open for diagnostic laboratories worldwide. We are aiming at two validation rounds per year (spring and autumn), a reasonable price of less than €150 per set, and a permanently expanding coverage of relevant bacterial pathogens. Any general or specific comments on sample composition or suggestions on additional bacterial, fungal, or parasitic organisms which should be covered, are highly appreciated.

Please do not feel irritated by some strong-positive samples among the present set. To make participants and ourselves familiar with the concept and the suitability of the proprietary sample matrix, "passing" should be easy in the initial rounds. But now as the program continues, it is our challenge (and duty) to rise at least some of the hurdles with every round of external validation.

Further information as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our quality control and proficiency test program "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT) can be downloaded in form of pdf-files at "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style. **New since 2009:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages).

Hopefully you found this kind of external validation benefitting and you will continue to join the future rounds of our EQAS scheme in bacterial genome detection (NAT/ PCR).

If you should have any further questions, please do not hesitate to contact me by e-mail: "[udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de](mailto:udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de)"

With best personal regards,



**Prof. Dr. Udo Reischl**

Organizer of the proficiency testing program "Bacterial Genome Detection"  
Member of the Quality Assurance Board (DGHM; German Society of Hygiene and Microbiology)

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider,  
Dr. V. Fingerle, Dr. U. Busch, Dr. D. Frangoulidis und PD Dr. W. Splettstösser**

## Brief discussion of the current results (English version) for the growing number of international participants:

### APRIL 2011

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

The current set of QC samples contained one sample with *N. gonorrhoeae* organisms ( $\sim 10^4$  CFU/mL in sample # 1115302) and one sample with *C. trachomatis* organisms ( $\sim 10^3$  IFU/mL in samples # 1115303). The other two "negative" samples contained significant amounts of *Neisseria meningitidis* (# 1115301) and *Neisseria cinerea* (# 1115304). The latter two *Neisseria* strains were included in the current distribution since they are considered to potentially cross-react with certain GO-specific NAT assays.

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. Among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 141 participants, only 5 false-positive and 2 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 2 participants for sample # 1115302 which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of  $\sim 10^4$  CFU/mL.

Interestingly, the assumed cross-reaction of certain GO-specific NAT assays with the related species *Neisseria meningitidis* (in sample # 1115301) was confirmed by 14 participants ( $\sim 10\%$ ) who reported the use of various commercial test systems or *in house* PCR protocols. With sample # 1115304 of the current distribution, which contained significant amounts of the species *Neisseria cinerea*, a cross-reaction of certain GO-specific NAT assays was apparent with a focus on BD ProbeTec. For the ease of interpretation, we created some extra tables where only the CT-specific results (table 4), the GO-specific results (table 5) and the false-negatives or false-positives sorted by the reported test system are depicted (table 6). As depicted in tables 5 and 6 of the statistical analysis, false positive results with *Neisseria meningitidis* (sample # 1115301) were observed sporadically but not systematically by 7 of 26 participants using the BD ProbeTec test, and by 7 of 55 participants indicating the use of "other commercial tests" or "in house PCR assays".

In contrast to this sporadic distribution of false-positive results with sample # 1115301, **systematic cross-reactions (false-positive PCR results for *Neisseria gonorrhoeae*) were observed by 26 of 26 participants using the BD ProbeTec test with *Neisseria cinerea* (sample # 1115304 of the current distribution).** In addition, some sporadic false-positive GO results were observed with this sample by 5 of 55 participants indicating the use of "other commercial tests", "*in house* PCR assays", or "other assays". It seems that the sample composition of our current EQAS distribution pointed out some weaknesses in analytical specificity with respect to the *N. gonorrhoeae*-specific component of current NAT assays designed for the combined detection of CT and GO.

One comment with respect to the use of RNA-based assays: due to the production scheme and microbial composition of our standardized QC matrices, we can not guarantee the stability or the integrity of RNA target molecules within the lyophilized sample materials. In order to highlight this aspect, the names and the corresponding frequencies of correct results were depicted in grey letters in table 3 of statistical analysis. Although there are numerous studies out which document the good performance of the GenProbe CT/NG test when applied to clinical specimens (and the fact that the two participants indicating the use of the GenProbe CT/NG test passed the current panel successfully), this aspect should be considered when new participants want to enroll in our comprehensive external quality assessment schemes for NAATs in diagnostic bacteriology.

### **RV 531: *Chlamydia trachomatis***

The current set of QC samples contained two samples with *C. trachomatis* target organisms (# 1115311 and # 1115314) with  $\sim 1 \times 10^3$  IFU/ml and two samples without target organisms (# 1115312 and # 1115313) containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*.

As depicted in table 2 of statistical analysis, false-negative results for sample # 1115311 ( $10^3$  IFU/ml of *C. trachomatis*) were reported by 4 of the 136 participants, false-negative results for sample # 1115314 ( $10^3$  IFU/ml of *C. trachomatis*) by 2 of the 136 participants, and 2 participants reported false-positive CT results for the remaining two "negative" samples of the current set. No specific correlation was observed between the event of reporting a false-negative result and the use of a specific commercial or *in-house* NAT assay. Overall, a very good diagnostic performance was observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 136 participants of the current distribution.

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

The current set of QC samples contained one sample with *N. gonorrhoeae* organisms ( $\sim 10^4$  CFU/mL in sample # 1115302) and one sample with *C. trachomatis* organisms ( $\sim 10^3$  IFU/mL in samples # 1115303). The other two "negative" samples contained significant amounts of *Neisseria meningitidis* (# 1115301) and *Neisseria cinerea* (# 1115304). The latter two *Neisseria* strains were included in the current distribution since they are considered to potentially cross-react with certain GO-specific NAT assays.

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. Among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 141 participants, only 5 false-positive and 2 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 2 participants for sample # 1115302 which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of  $\sim 10^4$  CFU/mL.

### **RV 532: *Bordetella pertussis***

The current set of QC samples contained only one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1115323;  $1 \times 10^4$  CFU/mL of target organisms), as well as three negative samples containing *Bordetella parapertussis*: sample # 1115321 with  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL, sample # 1115322 with  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL, and sample # 1115324 with  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL. The availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only 6 of the 127 participants reported false-negative results for the *B. pertussis* sample # 1115323 ( $\sim 10^4$  CFU/mL) and 9 participants observed consecutively false-positive results for each of the remaining three "negative" samples containing significant amounts of *B. parapertussis* organisms. The latter false-positivity issue is probably due to PCR assay designed for the general detection of *Bordetella* spp., GenoQuick Bordetella, which was recently introduced by HAIN Lifescience, Nehren, Germany, and used by 11 participants of the current distribution. Exceptionally for the current round of EQAS in *B. pertussis*, we have not scored those (false) positive results for the *B. parapertussis* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates when the use of GenoQuick Bordetella test was indicated. However, for participants who have observed false-negative results with sample # 1115323, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical sensitivity of their assay concepts.

All of the remaining results reported by the 127 participants were correct. Run controls were performed by 125 participants and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

### **RV 533: *Helicobacter pylori***

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain in a kind of dilution series. Sample # 1115332 contained

approximately  $1 \times 10^5$  CFU/ml, sample # 1115333 approximately  $1 \times 10^4$  CFU/ml and sample # 1115331 approximately  $1 \times 10^3$  CFU/ml of the respective target organisms.

All of the 44 participants reported positive results for sample # 1115332 ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml) and sample # 1115333 ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml) tested positive in the specific PCR assays of 43 from the 44 participants. The weak positive sample, which contained only about  $1 \times 10^3$  CFU/ml of *Helicobacter pylori* organisms, was still tested positive by 35 of 44 participants. No false-positive results were observed among the 44 participants for sample # 1115332, which contained only a significant number of *E. coli* cells within our proprietary sample matrix. The results of the current distribution again indicate a satisfactorily high level of assay specificity and sensitivity in the majority of the participating laboratories. As mentioned in the Report form, participants who are performing molecular tests for Clarithromycin resistance may indicate the corresponding results by accessory code numbers 71 or 72. Molecular resistance testing results were reported by 29 participants – with the exception of two results, they were all correct.

### **RV 534: EHEC / STEC**

The current distribution of QC samples contained only one sample with a big amount of EHEC, *E. coli*, clinical isolate, *stx1*-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive (# 1115344;  $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL), one sample with an *eae*-positive EPEC strain (sample # 1115343), and one sample containing significant amounts of *Yersinia spp.* (# 1115342). Sample # 1115341 contained an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain. Overall, there was a pretty good diagnostic performance of the EHEC-specific assays used by the 80 participants and only one false-positive result was observed for sample # 1115341 (presumably a sporadic contamination issue) and 10 false-positive results for sample # 1115343, containing significant amounts of a clinical EPEC isolate (only *eae*-positive). Either the 10 participants, who reported false-positive results for this sample, have wrongly considered the *eae* gene as a surrogate marker gene for EHEC or they experienced contamination events from the neighbouring positive sample # 1115344 in the course of sample preparation or sample processing. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of the EHEC distribution. Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 71 laboratories and all of the reported results were correct

### **RV 535: *Borrelia burgdorferi***

Due to numerous requests in the past few months, 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.

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Borrelia afzelii* organism in our proprietary matrix: sample # 1115351 ( $1 \times 10^6$  organisms/mL), sample # 1115353 ( $1 \times 10^4$  organisms/mL) and sample # 1115354 ( $1 \times 10^3$  organisms/mL). Sample # 1115352 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Leptospira interrogans*.

A relatively high amount of *Borrelia afzelii* ( $\sim 1 \times 10^6$  organisms/mL) was present in sample # 1115351, which consequently tested positive by all of the reporting 119 participating laboratories. Sample # 1115353 with an about 100-fold lower number of *B. afzelii* organisms was tested "positive" by 116 participants. The 3 participants (who missed this particular sample) should consider to improve the analytical sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. Sample # 1115354, which contained a relatively small amount of *B. afzelii* target organisms ( $\sim 10^3$  organisms per mL), was still tested "positive" by 106 of the 119 participants and "questionable" by one of the participating laboratories.

Since the bacterial load was relatively low, we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. Sample # 1115352 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *Leptospira*

*interrogans* cells. Only one participant reported a false-positive result for this negative sample (presumably due to some intralaboratory cross-contamination events or limitations in analytical specificity of the corresponding PCR protocol). Next to the two commercial assays provided with a designated code number, participants indicated the use of the following commercial assays or kits on their report form: TIB Molbiol LightMix *Borrelia* (6x), Qiagen artus *Borrelia* LC PCR Kit (4x), EliGene *Borrelia* LC 2 from Elisabeth Pharmacon (3x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (3x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (2x), Demeditec GenFlow *Borrelia* Plus (1x), Immundiagnostik MutaGEL *Borrelia* (1x), Zecken Screening Kit von Autoimmun Diagnostika (1x), ixSave *Borrelia* LC und ixSave *Borrelia* TM von Gerbion (1x), und Ingenetix *Borrelia burgdorferi sensu latu sp.* Assay (1x).

### **RV 536: *Legionella pneumophila***

In order to assess the analytical sensitivity of certain *Legionella pneumophila*-specific PCR assays, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Legionella pneumophila* serogroup 1: sample # 1115364 ( $1 \times 10^5$  CFU/ml), sample # 1115362 ( $1 \times 10^4$  CFU/ml) and sample # 1115361 ( $1 \times 10^3$  CFU/ml). Sample # 1115363 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. With the exception of one false-negative result for sample # 1115364, this *L. pneumophila*-positive sample was tested positive by 93 of the 94 participating laboratories. As expected, a higher number of "false-negative" results were observed with samples # 1115362 ( $1 \times 10^4$  CFU/ml) and # 1115361 ( $1 \times 10^3$  CFU/ml), which contained approximately tenfold and hundredfold less amounts of *L. pneumophila* organisms. As it seems that the lower limit of detection of currently established PCR assays is touched somehow with the weak positive samples, we have not scored a (false) negative result for samples # 1115361 and # 1115362 in the course of issuing the corresponding QC certificates.

Since no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1115363, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

### **RV 537: *Salmonella enterica***

The current set of QC samples contained two samples with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (sample # 1115372 with  $5 \times 10^4$  CFU/ml, and sample # 1115374 with  $5 \times 10^3$  CFU/ml) Sample # 1115373 contained this time a *Yersinia spp.* Strain and sample # 1115371 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. The discussion of the PCR results reported by the 11 participants of the current distribution is very concise: no false-positive or false-negative results were reported for the QC samples, no cross-reactions with the *E. coli* strain were observed, and the percentage of true positive results as well as for true-negative results was 100 %. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays.

### **RV 538: *Listeria spp.***

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1115384; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes*. In order to assess the analytical sensitivity of the NAT assays currently used at the participating laboratories, we decided to include also some weak positive samples in the current distribution. Relatively low numbers of *L. monocytogenes* cells ( $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL and  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) were present in samples # 1115381 and # 1115383, respectively, and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays applied by 28 and 29 of the 30 participants. Although the third "positive" sample contained a remarkably low amount of target organisms (# 1115382;  $\sim 5 \times 10^2$  CFU/mL of *L. monocytogenes*), it was nice to see that almost all of the 30 participating laboratories were still able to detect the corresponding DNA by their *Listeria*-specific PCR assays.

As mentioned in the Report form, participants who are performing molecular tests covering only *L. monocytogenes* may indicate the corresponding results by the accessory code number 71. When the use of *L. monocytogenes*-specific PCR assays is indicated, we do not score (false) negative results for non-*Listeria monocytogenes* species (which may be present in future distributions) in the course of issuing the corresponding QC certificates. It is nice to see that correct results were reported by the majority of participating laboratories in the course of this external PCR assay validation - and, again, this indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *L. monocytogenes*-specific PCR assays.

### **RV 539: MRSA**

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA 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.

To make life a little bit easier (after several rounds of demanding MRSA PCR proficiency testing containing some "difficult" samples with mixed species or exotic SCC<sub>mec</sub> cassette types), the current set contained two identical samples with significant amounts of a typical community acquired (CA)-MRSA isolate and a sample containing significant amounts of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci next to a negative sample.

Samples # 1115392 and # 1115393 of the current set contained a typical cMRSA organisms (MRSA, PVL-positive,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml). With the exception of 1 participant, who reported a "questionable" result for sample # 1115392, both MRSA positive samples were tested positive by all of the participants. Next to 202 negative results, 4 false-positive results and 2 "questionable" results were reported for sample # 1115394 containing a clinical isolate of a methicillin-resistant CoNS strain (*S. epidermidis*, *mecA*-positive,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml). To make a short and easy story complete, MRSA-negative sample # 1115391 of the current set (which contained only *E. coli* and human cells), was tested correctly negative by 206 of the 208 participants. The surprisingly low number of false-positive results seen with the latter two samples indicates the broad application of sophisticated diagnostic workflows without significant contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

Except the minor issue with 4 false positive MRSA results in the CoNS sample # 1115394, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and most of the applied MRSA-specific PCR assays have shown a very good overall diagnostic performance. Molecular detection of the *lukF/S-PV* gene was performed by 52 of the 208 participating laboratories - all laboratories correctly classified the cMRSA strain in samples #1115392 and #1115392 as PVL-positive.

### **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 want 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.

**Note to the participants from Professor Dr. Matthias Maaß** (Institute of Medical Microbiology, Hygiene and Infectiology, University Hospital of Salzburg, Salzburg, Austria; INSTAND e.V. reference laboratory for RV 540) **regarding latest developments in chlamydial**



**taxonomy** reflected in the new 2nd edition of the Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Only one single genus (*Chlamydia*) is now considered valid in the *Chlamydiaceae* family. The intermittently used genus "*Chlamydophila*" has been dropped on base of critical evaluations of the 16S rRNA gene sequences and the goal of taxonomy to maintain stability in the nomenclature (Ref.: 1. Kuo CC, Stephens RS, Bavoil P, Kaltenboeck B. Genus I. Chlamydia Jones Rake and Steams 1945,55AL. In: Krieg NR et al. (eds.) Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume Four. Springer, New York, NY, 2nd ed. 2011: 846-865).

To assess the analytical sensitivity of the NAT-assays used by the individual participating laboratories, the current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1115402 was spiked with  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml of *C. pneumoniae* whereas sample # 1115403 contained an approximately tenfold lower number of *C. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^3$  IFU/ml). Sample # 1115404 contained significant numbers of *Haemophilus influenzae* organisms (a species which can be found in typical respiratory specimens) to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1115401. As depicted in table 2, no false-negative results were observed for the positive sample # 1115402 ( $10^4$  IFU/mL) and only 3 false-negative results were observed for the tenfold weaker positive sample # 1115403 ( $10^3$  IFU/ml). Since no false-positive results were observed for the "negative" sample # 1115401, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. One participant reported a false-positive result for sample # 1115404 (*Haemophilus influenzae*) which could be due to certain shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

Otherwise 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 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 comprised of two groups where each group of 4 samples contained a kind of dilution series of *M. pneumoniae* organisms in the sample matrix. For **group 1**: sample # 1115411 contained about  $1 \times 10^5$  genome copies/mL, sample # 1115414 about  $1 \times 10^4$  genome copies/mL, sample # 1115413 about  $1 \times 10^3$  genome copies/mL of a *M. pneumoniae* strain and sample # 1115412 contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. For **group 2**: the strong positive sample # 1115416 contained about  $1 \times 10^6$  genome copies/mL, sample # 1115418 about  $1 \times 10^5$  genome copies/mL, sample # 1115415 about  $1 \times 10^4$  genome copies/mL of a *M. pneumoniae* strain and sample # 1115417 contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells.

As also observed during the past distributions of our EQAS scheme 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. Among the *M. pneumoniae*-specific results reported by the **105 participants in group 1**, all but one laboratories reported correct positive results for the positive sample # 1115411, and 95 of the 105 participants reported correct positive results for the weaker positive sample # 1115414 (containing about  $1 \times 10^4$  genome copies/mL of the *M. pneumoniae* target organisms). The 10 participants, who missed this

particular sample or classified their result as "questionable", may consider to improve the analytical sensitivity of their individual assay concepts. Sample # 1115413, which contained an approximately ten-fold lower number of *M. pneumoniae* target organisms ( $10^3$  genome copies/mL), was still tested "positive" by 68 of the 105 participants in group 1. Since the bacterial load was relatively low, we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. Sample # 1115412 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. Since no false-positive results were observed for the "negative" sample, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

Only correct PCR results for the 3 positive and the negative sample were reported by the **7 participants of group 2**. So for group 2 there is no further discussion needed.

### **RV 542: *Coxiella burnetii***

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 a kind of dilution series of *Coxiella burnetii* organisms in the sample matrix: sample # 1115421 contained about  $1 \times 10^6$  CFU/mL, sample # 1115422 about  $1 \times 10^3$  organisms/mL and sample # 1115423 about  $1 \times 10^2$  organisms/mL of a *Coxiella burnetii* strain. A relatively high amount of *C. burnetii* organisms were present in sample # 1115421, which consequently was tested positive by all of the 16 participating laboratories. Sample # 1115422, which contained an approximately thousand-fold lower number of *C. burnetii* target organisms per mL, was still tested "positive" by 14 of the 16 participants. The 2 participants (who missed this particular sample) may consider to improve the analytical sensitivity of their individual assay concepts. Sample # 1115423, which contained a relatively small amount of *C. burnetii* target organisms ( $\sim 1 \times 10^2$  organisms per mL), was reported "positive" by 8 of the 16 participating laboratories. Since the bacterial load was relatively low, we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. Sample # 1115424 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. Since no false-positive results were observed for the "negative" sample, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. With the exception of two false-negative results observed with the positive sample # 1115422 containing about  $1 \times 10^3$  target organisms, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

### **RV 543: *Francisella tularensis***

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

The current set of QC samples contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis holarctica* ( $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL) was present in sample # 1115431, an approximately hundred-fold lower amount ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) was present in sample # 1115432, and an approximately thousandfold lower amount ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) was present in sample # 1115433. With the exception of four false-negative results for sample # 1115432 and two false-negative

results for sample # # 1115433, the three samples containing various amounts of *Francisella tularensis holarctica* DNA were tested positive by all of the 7 participating laboratories. As expected, a higher number of false-negative results were observed with the samples containing a lower number of target organisms. As it seems that the lower limit of detection of currently established PCR assays is touched somehow with the weak positive samples, we have not scored a (false) negative result for samples # 1115432 and # 1115433 in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who have missed the target organisms in sample # 1115432 but are aiming at a very high analytical performance should consider to improve the sensitivity of their individual assay concepts. As no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1115434, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and we are looking forward to some interesting sample panel compositions in the forthcoming rounds of our novel external quality assessment scheme (EQAS) for *Francisella tularensis*.

**PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO  
 (RV 530) April 2011**



**Tabelle 1:** Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115301	∅ / ∅	64	<i>Neisseria meningitidis</i>
1115302	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115303	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)
1115304	∅ / ∅	64	<i>Neisseria cinerea</i>

**Tabelle 2:** Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 141</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1115301	1115302	1115303	1115304	1115301	1115302	1115303	1115304	
<b>Befund Result</b>									
<b>Positiv CT</b>	1	0	136	1	n.d.	0	0	0	0
<b>Positiv CT &amp; GO</b>	0	2	3	1	nein / no	140	141	141	140
<b>Positiv GO</b>	13	137	0	29	ja / yes	1	0	0	1
<b>Negativ</b>	126	2	2	109					
<b>Fraglich /questionable</b>	1	0	0	1					

**Tabelle 3:** Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwenden verschiedener Methoden. *Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	3	3 / 4	75	4	4 / 4	100
LightMix CT/NG [21] (n = 11)	22	22 / 22	100	22	22 / 22	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 24)	47	47 / 48	98	48	48 / 48	100
COBAS Amplicor [23] (n = 17)	34	34 / 34	100	34	34 / 34	100
BD ProbeTec [24] (n = 26)	52	52 / 52	100	18	18 / 52	35
Artus CT [25] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 30)	60	60 / 60	100	60	60 / 60	100
Other commercial tests [27] (n = 29)	56	56 / 58	97	48	48 / 56 <sup>§</sup>	86
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 23)	45	45 / 46	98	38	38 / 46	83
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 6	100	4	4 / 6	67

Legend for Table 3:

- \* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.
- § Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

**Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden. Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für *Chlamydia trachomatis* dargestellt.**  
 Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods

**Note: only the *C. trachomatis*-specific results are depicted in this table.**

NAT-Methode ( <b>nur CT</b> ) [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	1	1 / 2	50	6	6 / 6	100
LightMix CT/NG [21] (n = 11)	11	11 / 11	100	33	33 / 33	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 24)	24	24 / 24	100	72	72 / 72	100
COBAS Amplicor [23] (n = 17)	17	17 / 17	100	51	51 / 51	100
BD ProbeTec [24] (n = 26)	26	26 / 26	100	78	78 / 78	100
Artus CT [25] (n = 4)	4	4 / 4	100	12	12 / 12	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 30)	30	30 / 30	100	90	90 / 90	100
Other commercial tests [27] (n = 29)	28	28 / 29	97	84	84 / 87	97
In house PCR assay [28] (n = 23)	22	22 / 23	96	67	67 / 69	97
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	3	3 / 3	100	9	9 / 9	100

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

**Tabelle 5: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden. Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für *Neisseria gonorrhoeae* dargestellt.**

*Note: only the N. gonorrhoeae-specific results are depicted in this table.*

NAT-Methode ( <b>nur GO</b> ) [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	2	2 / 2	100	6	6 / 6	100
LightMix CT/NG [21] (n = 11)	11	11 / 11	100	33	33 / 33	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 24)	23	23 / 24	96	72	72 / 72	100
COBAS AmpliCor [23] (n = 17)	17	17 / 17	100	51	51 / 51	100
BD ProbeTec [24] (n = 26)	26	26 / 26	100	44	44 / 78	56
Artus CT [25] (n = 4)	4	4 / 4	100	12	12 / 12	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 30)	30	30 / 30	100	90	90 / 90	100
Other commercial tests [27] (n = 29)	28	28 / 29	97	79	79 / 85 <sup>§</sup>	93
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 23)	23	23 / 23	100	63	63 / 69	91
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	3	3 / 3	100	7	7 / 9	78

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.  
<sup>§</sup> Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

**Tabelle 6: Falsch-positive und falsch-negative NAT-Befunde nach Methode**  
*False-positive and -negative NAT results with commercial or in-house assays*

NAT-Methode NAT method	Positive samples		Negative samples	
	GO positive 1115302	CT positive 1115303	1115301	1115304
GenProbe CT/NG [20] (n = 2)	-	1/2 CT-	-	-
LightMix CT/NG [21] (n = 11)	-	-	-	-
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 24)	1/24 GO-	-	-	-
COBAS AmpliCor [23] (n = 17)	-	-	-	-
BD ProbeTec [24] (n = 26)	-	1/26 GO+	7/26 GO+	26/26 GO+
Artus CT [25] (n = 4)	-	-	-	-
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 30)	-	-	-	-
Other commercial tests [27] (n = 29)	1/29 CT+ 1/29 GO-	1/29 GO+ 1/29 CT-	3/29 GO+	2/29 GO+ 2/29 CT+
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 23)	1/23 CT+	1/23 GO+ 1/23 CT-	3/23 GO+ 1/23 CT+	2/23 GO+
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	-	-	1/3 GO+	1/3 GO+

## PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis* (RV 531) April 2011



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115311	<b>+</b>	<b>61</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)
1115312	<b>Ø</b>	<b>62</b>	<i>Escherichia coli</i> K12
1115313	<b>Ø</b>	<b>62</b>	<i>Escherichia coli</i> K12
1115314	<b>+</b>	<b>61</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 136</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	<b>1115311</b>	<b>1115312</b>	<b>1115313</b>	<b>1115314</b>		<b>1115311</b>	<b>1115312</b>	<b>1115313</b>	<b>1115314</b>
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	<b>132</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>134</b>	n.d.	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>Negativ</b>	<b>4</b>	<b>135</b>	<b>135</b>	<b>2</b>	nein <i>no</i>	<b>136</b>	<b>136</b>	<b>136</b>	<b>136</b>
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	ja <i>yes</i>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 25)</b>	<b>50</b>	50 / 50	<b>100</b>	<b>50</b>	50 / 50	<b>100</b>
<b>LightMix CT [21] (n = 4)</b>	<b>7</b>	7 / 8	<b>88</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>
<b>Roche COBAS TaqMan [22] (n = 38)</b>	<b>75</b>	75 / 76	<b>99</b>	<b>76</b>	76 / 76	<b>100</b>
<b>COBAS Amplicor [23] (n = 6)</b>	<b>11</b>	11 / 12	<b>92</b>	<b>12</b>	12 / 12	<b>100</b>
<b>BD ProbeTec [24] (n = 18)</b>	<b>36</b>	36 / 36	<b>100</b>	<b>36</b>	36 / 36	<b>100</b>
<b>Artus CT [25] (n = 11)</b>	<b>22</b>	22 / 22	<b>100</b>	<b>22</b>	22 / 22	<b>100</b>
<b>Abbott CT/NG [26] (n = 5)</b>	<b>8</b>	8 / 10	<b>80</b>	<b>10</b>	10 / 10	<b>100</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 12)</b>	<b>24</b>	24 / 24	<b>100</b>	<b>22</b>	22 / 24	<b>92</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 16)</b>	<b>32</b>	32 / 32	<b>100</b>	<b>32</b>	32 / 32	<b>100</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 2)</b>	<b>3</b>	3 / 4	<b>75</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

**PCR-/NAT *Bordetella pertussis*  
 (RV 532) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115321	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1115322	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115323	+	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12748 (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115324	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 127</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1115321	1115322	1115323	1115324	1115321	1115322	1115323	1115324	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	9	9	121	9	n.d.	2	2	2	2
<b>Negativ</b>	118	118	6	118	nein <i>no</i>	125	125	125	125
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
Roche LightCycler Kit [20] (n = 2)	1	1 / 1	100	3	3 / 3	100
Other commercial tests [27] (n = 43)	42	42 / 43	98	110	110 / 126	87
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 78)	74	74 / 78	95	226	226 / 234	97
Andere / k.A. / other [29] (n = 5)	4	4 / 5	80	12	12 / 15	80



**PCR-/NAT *Helicobacter pylori*  
 (RV 533) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115331	<b>+</b>	61/72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA sequence)
1115332	<b>+++</b>	61/72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA sequence)
1115333	<b>++</b>	61/72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA sequence)
1115334	<b>Ø</b>	62	<i>Escherichia coli</i> K12

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 44</i>	<b>Probennummer (Sample no.)</b>				<b>Inhibition</b>				
	1115331	1115332	1115333	1115334	1115331	1115332	1115333	1115334	
<b>Befund Result</b>									
<b>Positiv</b>	35 <sup>1)</sup>	44 <sup>1)</sup>	43 <sup>1)</sup>	0	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	9	0	1	44	nein no	43	43	43	43
<b>Fraglich Questionable</b>	0	0	0	0	ja yes	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**  
*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>Commercial assay [27] (n = 14)</b>	<b>40</b>	40 / 42	<b>95</b>	<b>14</b>	14 / 14	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 27)</b>	<b>74</b>	74 / 81	<b>91</b>	<b>27</b>	27 / 27	<b>100</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 3)</b>	<b>8</b>	8 / 9	<b>89</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>

**Comments:** <sup>1)</sup> Twenty-nine of the 44 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. With the exception of 2 laboratories, all reported results were correct.

**PCR-/NAT EHEC / STEC  
 (RV 534) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115341	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i> )
1115342	∅	62	<i>Yersinia spp.</i>
1115343	∅	62 / 77	EPEC ( <i>eae</i> weak positive)
1115344	+++	61 / 71, 77, 78	EHEC (~1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) ( <i>stx-1</i> , <i>eae</i> , <i>hlyA</i> )

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 80</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
<i>Befund Result</i>	1115341	1115342	1115343	1115344	1115341	1115342	1115343	1115344	
<b>Positiv</b>	1	0	10	80 <sup>1)</sup>	n.d.	2	2	2	2
<b>Negativ</b>	79	80	69	0	nein no	78	78	78	78
<b>Fraglich Questionable</b>	0	0	1	0	ja yes	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>GenoType EHEC (Hain) [20] (n = 17)</b>	<b>17</b>	17 / 17	<b>100</b>	<b>47</b>	47 / 51	<b>92</b>
<b>Hyplex EHEC [21] (n = 5)</b>	<b>5</b>	5 / 5	<b>100</b>	<b>11</b>	11 / 15	<b>73</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 1)</b>	<b>1</b>	1 / 1	<b>100</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 56)</b>	<b>56</b>	56 / 56	<b>100</b>	<b>164</b>	164/167 <sup>§</sup>	<b>98</b>
<b>Andere/ k.A. / other [29] (n = 1)</b>	<b>1</b>	1 / 1	<b>100</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>

<sup>§</sup> Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

**Comments:** <sup>1)</sup> Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 71 laboratories.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*  
 (RV 535) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115351	+++	61	<i>Borrelia afzelii</i> , Pko (~ 1x10 <sup>6</sup> organisms/mL)
1115352	∅	62	<i>Leptospira interrogans</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> organisms/mL)
1115353	++	61	<i>Borrelia afzelii</i> , Pko (~ 1x10 <sup>4</sup> organisms/mL)
1115354	(+)	61	<i>Borrelia afzelii</i> , Pko (~ 1x10 <sup>3</sup> organisms/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 119</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1115351	1115352	1115353	1115354		1115351	1115352	1115353	1115354
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	119	1	116	106	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	0	118	3	12	nein <i>no</i>	118	118	118	118
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	1	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>RealArt Borrelia [20] (n = 17)</b>	<b>49</b>	49 / 51	<b>96</b>	<b>16</b>	16 / 17	<b>94</b>
<b>Demeditec GenFlow [21] (n = 10)</b>	<b>28</b>	28 / 30	<b>93</b>	<b>10</b>	10 / 10	<b>100</b>
<b>Other/commercial tests [27] (n = 26)</b>	<b>76</b>	76 / 78	<b>97</b>	<b>26</b>	26 / 26	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 65)</b>	<b>185</b>	185 / 194 <sup>§</sup>	<b>95</b>	<b>65</b>	65 / 65	<b>100</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 2)</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

<sup>§</sup> Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

**PCR-/NAT *Legionella pneumophila*  
 (RV 536) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115361	(+)	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL)
1115362	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115363	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1115364	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 94</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1115361	1115362	1115363	1115364		1115361	1115362	1115363	1115364
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	53	78	0	93	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	41	15	94	1	nein <i>no</i>	93	93	93	93
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	1	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
BD ProbeTec Legionella [26] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100
Other commercial tests [27] (n = 38)	82	82 / 114	72	38	38 / 38	100
In house PCR assay [28] (n = 56)	142	142 / 167 <sup>§</sup>	85	56	56 / 56	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

§ Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

**Comments:** 1) As sample # 1115361 contained a very low number of *Legionella pneumophila* target organisms, negative PCR results were not rated as "false negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*  
 (RV 537) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**

*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115371	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1115372	+++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 5x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115373	∅	62	<i>Yersinia</i> spp.
1115374	++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 5x10 <sup>3</sup> CFU/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**

*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 11</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1115371	1115372	1115373	1115374		1115371	1115372	1115373	1115374
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	0	11	0	11	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	11	0	11	0	nein <i>no</i>	11	11	11	11
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
Other commercial tests [27] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
In house PCR assay [28] (n = 9)	18	18 / 18	100	18	18 / 18	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100

**PCR-/NAT *Listeria spp.*  
 (RV 538) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115381	++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 5x10 <sup>3</sup> CFU/mL)
1115382	+	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 5x10 <sup>2</sup> CFU/mL)
1115383	++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115384	Ø	62	<i>Escherichia coli</i> K12

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 30</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
<i>Befund Result</i>	1115381	1115382	1115383	1115384	1115381	1115382	1115383	1115384	
<b>Positiv</b>	29	29	28	0	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	1	1	2	30	nein <i>no</i>	30	30	30	30
<b>Fraglich <i>Questionable</i></b>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
Other commercial tests [27] (n = 5)	11	11 / 15	73	5	5 / 5	100
In house PCR assay [28] (n = 24)	72	72 / 72	100	24	24 / 24	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100

**PCR-/NAT MRSA / cMRSA  
 (RV 539) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115391	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1115392	++	61 / 71,72	cMRSA ( <i>S. aureus</i> , oxa <sup>R</sup> , PVL-pos) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1115393	++	61 / 71,72	cMRSA ( <i>S. aureus</i> , oxa <sup>R</sup> , PVL-pos) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1115394	∅	62 / 76	CoNS (oxa <sup>R</sup> ) (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 208</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>			
	1115391	1115392	1115393	1115394	1115391	1115392	1115393	1115394
<b>Befund</b> <i>Result</i>								
<b>Positiv</b>	2	207	208	4	n.d.	2	2	2
<b>Negativ</b>	206	0	0	202	nein <i>no</i>	206	206	206
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	1	0	2	ja <i>yes</i>	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.** *Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
BD GeneOhm MRSA [20] (n=38)	76	76 / 76	100	76	76 / 76	100
GenoType MRSA Direct [21] (n=41)	82	82 / 82	100	81	81 / 82	99
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=6)	11	11 / 11 §	100	11	11 / 11 §	100
LightCycler Kits [23] (n=4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=50)	100	100 / 100	100	99	99 / 100	99
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=20)	40	40 / 40	100	40	40 / 40	100
Commercial assay kit [27] (n=10)	20	20 / 20	100	19	19 / 19 §	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n=42)	84	84 / 84	100	80	80 / 84	95
Andere / k.A. / other [29] (n=9)	18	18 / 18	100	18	18 / 18	100

\* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.  
*Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.*

§ Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

**Comments:** <sup>1)</sup> A dedicated cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 52 laboratories. All reported results were correct.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*  
 (RV 540) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115401	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1115402	++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> IFU/mL)
1115403	+	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)
1115404	∅	62	<i>Haemophilus influenzae</i>

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 108</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	<i>1115401</i>	<i>1115402</i>	<i>1115403</i>	<i>1115404</i>		<i>1115401</i>	<i>1115402</i>	<i>1115403</i>	<i>1115404</i>
<i>Befund Result</i>									
<b>Positiv</b>	<b>0</b>	<b>108</b>	<b>105</b>	<b>1</b>	n.d.	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Negativ</b>	<b>108</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>107</b>	nein no	<b>108</b>	<b>108</b>	<b>108</b>	<b>108</b>
<b>Fraglich Questionable</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	ja yes	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n = 11)</b>	<b>22</b>	22 / 22	<b>100</b>	<b>22</b>	22 / 22	<b>100</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 36)</b>	<b>71</b>	71 / 72	<b>99</b>	<b>72</b>	72 / 72	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 61)</b>	<b>120</b>	120 / 122	<b>98</b>	<b>121</b>	121 / 122	<b>99</b>



**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae***  
**(RV 541) April 2011, Group 1**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

Group 1	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1115411	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>5</sup> genome copies/mL)
1115412	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1115413	(+)	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>3</sup> genome copies/mL)
1115414	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>4</sup> genome copies/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

n = 105	Probennummer (Sample no.)				Inhibition
	1115411	1115412	1115413	1115414	
Befund Result					
Positiv	104	0	68	95	n.d.
Negativ	1	103	36 <sup>1)</sup>	8	nein no
Fraglich Questionable	0	2	1	2	ja yes

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 10)	18	18 / 29 <sup>§</sup>	62	10	10 / 10	100
Qiagen <i>M.pneumoniae</i> [21] (n = 5)	15	15 / 15	100	4	4 / 4 <sup>§</sup>	100
Minerva Venor Mp [22] (n = 1)	3	3 / 3	100	0	0 / 0 <sup>§</sup>	-
Commercial assay / kit [27] (n = 33)	79	79 / 99	80	33	33 / 33	100
In house PCR assay [28] (n = 54)	151	151/160 <sup>§</sup>	94	54	54 / 54	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 6	33	2	2 / 2	100

<sup>§</sup> Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample # 1115413 contained a very low number of *Mycoplasma pneumoniae* target organisms, negative PCR results were not rated as "false negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae***  
**(RV 541) April 2011, Group 2**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

Group 2	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115415	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>4</sup> genome copies/mL)
1115416	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>6</sup> genome copies/mL)
1115417	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1115418	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>5</sup> genome copies/mL)

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 7</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	<b>1115415</b>	<b>1115416</b>	<b>1115417</b>	<b>1115418</b>		<b>1115415</b>	<b>1115416</b>	<b>1115417</b>	<b>1115418</b>
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	7	7	0	7	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	0	0	7	0	nein <i>no</i>	7	7	7	7
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**  
*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 1)</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>	<b>1</b>	1 / 1	<b>100</b>
<b>Commercial assay / kit [27] (n = 1)</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>	<b>1</b>	1 / 1	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n =5)</b>	<b>15</b>	15 / 15	<b>100</b>	<b>5</b>	5 / 5	<b>100</b>

**PCR-/NAT *Coxiella burnetii***  
**(RV 542) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115421	+++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 <sup>6</sup> genome copies/mL)
1115422	+	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> genome copies/mL)
1115423	(+)	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 <sup>2</sup> genome copies/mL)
1115424	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 16</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1115421	1115422	1115423	1115424	1115421	1115422	1115423	1115424	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	16	14	8	0	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	0	2	8 <sup>1)</sup>	16	nein <i>no</i>	15	15	15	15
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.**  
*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 16)</b>	<b>38</b>	38 / 48	<b>79</b>	<b>16</b>	16 / 16	<b>100</b>

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample # 1115423 contained a very low number of *Coxiella burnetii* target organisms, negative PCR results were not rated as "false negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Francisella tularensis*  
 (RV 543) April 2011**



**Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.**  
*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1115431	+++	61	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
1115432	+	61	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1115433	(+)	61	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL)
1115434	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

**Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.**  
*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 7</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
<i>Befund Result</i>	1115431	1115432	1115433	1115434	1115431	1115432	1115433	1115434	
<b>Positiv</b>	7	3	5	0	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	0	4 <sup>1)</sup>	2 <sup>1)</sup>	7	nein no	7	7	7	7
<b>Fraglich Questionable</b>	0	0	0	0	ja yes	0	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwenden verschiedener Methoden.**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>LightMix <i>F.tularensis</i> [20] (n =3)</b>	<b>7</b>	7 / 9	<b>78</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 3)</b>	<b>7</b>	7 / 9	<b>78</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n =1)</b>	<b>1</b>	1 / 3	<b>33</b>	<b>1</b>	1 / 1	<b>100</b>

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample # 1115432 and # 1115433 contained a very low number of *Francisella tularensis* target organisms, negative PCR results were not rated as “false negative”, but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.