



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
Internet: 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



Regensburg, den 30. November 2011

RINGVERSUCHSAUSWERTUNG November 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 19-27 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 beigefügten 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 **Inet:** 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 den 4 Einzelproben des **RV 533** vier unterschiedliche **Helicobacter-Spezies** ausgesandt, die offensichtlich mit einigen *H. pylori*-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagieren. Das aktuelle Set des **Borrelien-Ringversuchs RV 535** enthielt ein hochinteressantes Spektrum von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu stricto Genotypen wie *Borrelia lusitaniae*, *B. garinii* und *B. valaisiana*. Im **RV 532** befand sich ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das mit einigen *B. pertussis*-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagierte (vgl. *J. Clin Microbiol.*, Dezember 2011, p. 4347-4348) und im **RV 539 (MRSA)** wurde diesmal ein sog. *livestock-associated (LA-)MRSA* CC398-Isolat ausgesandt, das aber von nahezu allen PCR-/NAT-Testsystemen der Ringversuchsteilnehmer problemlos als MRSA identifiziert werden konnte. Auch bei den neu ins INSTAND e.V. Programm aufgenommenen Ringversuchen für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* (**RV 542**) und *Francisella tularensis* (**RV 543**) ist insgesamt eine vielversprechende Ergebnislage zu beobachten.

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.

NOVEMBER 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* (Proben # 1125302 und # 1125304), sowie die positive Proben des RV 531 (# 1125311, und # 1125312), EHEC (Probe # 1125342), *Salmonella enterica* (Probe # 1125371), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1125403), *Francisella tularensis* (Probe # 1125434), sowie *Coxiella burnetii* (Probe # 1125424). 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 prozentuaalem 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"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (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 zwei der drei positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysensysteme für beide Zielorganismen im Großen und Ganzen 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* ($\sim 10^3$ IFU/mL, Probe # 1125302), eine Probe mit $\sim 10^4$ CFU/mL an *Neisseria gonorrhoeae* (# 1125301), eine Probe # 1125304, die neben *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL) diesmal auch Gonokokken in einer Menge von $\sim 10^4$ CFU/mL enthielt, sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1125303), die ausschließlich humane Zellen und *Escherichia coli* enthielt. Auch wenn die positiven Proben #1125302 und #1125304 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit relativ geringen Mengen an *C. trachomatis* Zielorganismen versetzt wurden, fanden sich unter den von insgesamt 141 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 1 falsch-positives und 4 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 # 1125301 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^4 CFU/mL) nur von 3 der insgesamt 141 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse, für die Probe # 1125304 (*N. gonorrhoeae*; ca. 1×10^4 CFU/mL) mit gleich hoher

Menge an Gonokokken jedoch von 14 der insgesamt 141 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Die schlechtere Ergebnislage bei der letztgenannten Probe (höhere Anzahl falsch-negativer Ergebnisse für GO) könnte mit der gleichzeitigen Anwesenheit von *C. trachomatis* in dieser Probe zusammenhängen. Manche der Testsysteme scheinen bei gleichzeitiger Anwesenheit von zwei unterschiedlichen Zielorganismen gewisse Defizite in der analytischen Sensitivität aufzuweisen. Angesichts der relativ hohen Menge an Gonokokken in dieser Probe sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Da das beobachtete Sensitivitätsproblem 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. Nach wie vor arbeiten wir an einer konstruktiven Lösung dieses "RNA-Problems" und hoffen in absehbarer Zeit auch Probenmaterial zur Verfügung stellen zu können, das funktionelle RNA Zielsequenzen der entsprechenden Erreger in stabiler Form und in routineüblichen Mengen enthält.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 141 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal von keinem Teilnehmer bei keiner der vier Einzelproben beobachtet. Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muß berücksichtigt werden, daß im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tabelle 3 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, und 5 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. **Anmerkung:** Bevor durch einen kurzen Blick auf die prozentualen Richtigkeitsquoten in diesen Tabellen ein eventuell etwas zu voreiliger Rückschluß auf die diagnostische "performance" bestimmter kommerzieller Testsysteme gezogen wird, sollten erst die effektiven Teilnehmerzahlen berücksichtigt werden, die den dargestellten Richtigkeitsquoten arithmetisch zugrundeliegen.

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche Cobas 4800 System (11x), TibMolbiol LightMix NG (4x), BD ProbeTec (4x), Amplex Hyplex STD (3x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (2x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (2x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (4x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (3x), Hain GenoQuick CT (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), Sacace *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* Real TM (1x), Sacace *N. gonorrhoeae* 370/660 IC (1x), Institute of applied biotechnologies *C. trachomatis*/*N. gonorrhoeae* detect (1x), Fast Track Diagnostics vaginal swab test (1x), Seegene STD Kit (1x), Bioron PCR Kit (1x) und Euroclone Duplica Real Time *N. gonorrhoeae* Detection Kit (1x).

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal zwei identische Proben mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1125311, und # 1125312 mit 10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1125313, und # 1125314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den beiden positiven Proben # 1125311, und # 1125312 lediglich von 6 der insgesamt 121 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bis auf 1 falsch-positives Ergebnis wurden diesmal bei den negativen Proben # 1125313, und # 1125314 durchwegs richtig negative Ergebnisse berichtet und unter den insgesamt 484 mitgeteilten Ergebnissen wurde lediglich ein Ergebnis als "fraglich" oder von den Teilnehmern im Ergebnisbogen als "inhibiert" klassifiziert.

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

Auch wenn mit 1×10^3 IFU/ml an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität 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 allen Teilnehmern durchgeführt und dabei keine Inhibitionsereignisse 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 (4x), Roche Cobas 4800 System (1x), Hain GenoQuick CT (2x), Sacace *C. trachomatis* Real TM (1x), Minerva Biolabs Onar CT qPCR Kit (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), und EliGene *C. trachomatis* LC (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt nur eine Probe mit einer sehr hohen Menge an *Bordetella pertussis* (# 1125324, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), und drei mit dem Zielorganismus eng

verwandte *Bordetella*-Spezies: Probe # 1125321 mit *Bordetella parapertussis*, Probe # 1125322 mit *Bordetella holmesii*, und eine Probe mit *Bordetella bronchiseptica* (# 1125323).

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 relativ hohen Richtigkeitsquoten.

Bei der Auswertung des aktuellen Ringversuchs ergibt sich jedoch ein besonderer Aspekt aus dem Umstand, daß von der Fa. HAIN Lifescience 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 7 Teilnehmern unter Code [27] explizit die Verwendung des HAIN GenoQuick Bordetella Kits angegeben wurde.

Im RV 532 befand sich ein IS481-positives *Bordetella holmesii*-Isolat, das mit einigen *B. pertussis*-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagierte. Die Aktualität dieser Problematik spiegelt sich auch in einer brandaktuellen Arbeit aus Frankreich wider: Njamkepo et al., Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *Clin Microbiol.*, Dezember 2011, p. 4347-4348). Insgesamt betrachtet scheint aber der Vorteil einer hochsensitiven Detektion von *B. pertussis* und *B. holmesii* über die Verwendung der repetitiven IS481-Zielsequenz die Nachteile einer (eher aus akademischer Sicht wünschenswerten) Differenzierungsmöglichkeit zwischen den beiden Spezies in der PCR-Routinediagnostik mehr als in der aufzuwiegen. Zudem scheint in unseren Breiten *B. holmesii* eher selten aufzutreten (*siehe* Antila et al., 2006, *J. Med. Microbiol.* 55:1043-1051) und Infektionen mit beiden Spezies scheinen eine gleichermaßen "behandlungsbedürftige" Symptomatik hervorzurufen. Eine Abgrenzung zu den übrigen (IS481-negativen) *Bordetella*-Spezies muß jedoch aus diagnostischer Sicht stets gewährleistet sein (*siehe* Ringversuchsdiskussion April 2011).

Angesichts der sehr hohen Richtigkeitsquote für die *B. pertussis*-positive Probe # 1125324 und der technisch bzw. methodisch bei der Verwendung der IS481-Zielsequenz zu erwartenden Kreuzreaktion mit *B. holmesii* in Probe # 1125322 hat sich der Ringversuchsleiter (in enger Abstimmung mit dem Sollwertlabor in Krefeld) dazu entschlossen, bei der Erteilung der Zertifikate die falsch-positiven Ergebnisse bei *B. holmesii* nicht als falsch-negativ zu bewerten. Die 9 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *B. parapertussis*-positiven Probe # 1125321 und die 3 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der *B. bronchiseptica*-positiven Probe # 1125323 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

Inhibitionskontrollen wurden von 112 der insgesamt 114 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei dem aktuellen Probenstet nur von einem Teilnehmer bei einer der vier Einzelproben 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 57 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 4 Teilnehmern die Verwendung die pertussis Toxin Gen und von 2 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 (7x), TibMolbiol LightMix BP (6x), Autoimmun Diagnostika CAP *B. pertussis* (6x), Autoimmun Diagnostika Community acquired Pneumonia Kit (1x), Mikrogen Diagenode *B. pertussis* / *B. parapertussis* kit (3x), *B. pertussis* / *B. parapertussis* von Cepheid (2x), *Bordetella* LCD Array Kit (2x), Dynex PneumoPlex (1x), Minerva Biolabs Onar Pertussis (1x), AmpliGnost BPPD-LC *B. pertussis* / *B. parapertussis* kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (3x), und Attomol *Bordetella* DNA-LINA (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal nur eine positive Probe mit *H. pylori* (# 1125331; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml, Clarithromycin-resistentes Isolat). Probe # 1125332 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter salomonis* ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), Probe # 1125333 eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter bizzozeronii* ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml), und Probe # 1125334 eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter felis* ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml). Die DNA in den drei Proben mit "nicht-pylori *Helicobacter*-Spezies" erzeugte bei einigen Teilnehmern offensichtlich falsch-positive Ergebnisse für *H. pylori* (vermutlich eher durch Kreuzreaktionen als durch Kreuzkontaminationsereignisse). Bei dem Großteil der insgesamt 41 Teilnehmer wurden mit den jeweils eingesetzten NAT-Testsystemen jedoch keine "spezifischen" Amplifikationsprodukte beobachtet und diese 3 Proben somit auch korrekt als *H. pylori*-negativ bewertet. Die mit ca. 10^4 CFU/ml an Zielorganismen versetzte *H. pylori*-positive Probe (# 1125331) wurde von 40 der insgesamt 41 Teilnehmer korrekterweise als positiv befundet.

Insgesamt betrachtet schnitten sowohl die kommerziellen als auch die eigenentwickelten Testsysteme im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab.

Bis auf 14 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" 8 x GenoType Helico Kit von HAIN Lifescience und 1 x *H. pylori* Real TM von Sacace angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei allen 41 Teilnehmern 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 41 Teilnehmer mitgeteilt, und diese waren durchwegs korrekt. Die Zielwerte für die molekularbiologische Resistenztestung der ausgesandten Isolate sind in Tabelle 1 aufgeführt.

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 positive Probe mit ca. 1×10^5 CFU/ml (# 1125341: *E. coli*, nur *stx*₁-positiv), eine positive Probe mit ca. 1×10^3 CFU/ml (# 1125342: *E. coli*, *stx*₁-positiv, *stx*₂-positiv, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv), eine Probe mit 1×10^4 CFU/ml an *Salmonella enteritidis* (# 1125343), sowie eine Probe mit einem *E. coli* K12 Stamm # 1125344; *eae*-, *hlyA*- negativ).

Abgesehen von der schwach-positiven EHEC Probe # 1125342 (mit ca. 10^3 CFU/ml) 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 das jeweils eine falsch-positive PCR-Ergebnis bei Probe # 1125344 und das falsch-negative PCR-Ergebnis bei der hoch-positiven Probe # 1125341 gibt es keine naheliegenden Erklärungen - eventuell könnte man in ersterem Fall über das Auftreten von Kontaminationsereignissen durch die benachbarte EHEC-

positive Probe während der Probenaufreinigung und Prozessierung der PCR-Reaktionsansätze spekulieren. Erfreulicherweise wurde auch von keinem Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis bei Probe # 1125343 (*Salmonella enteritidis*) mitgeteilt, was für eine ausreichend gute Spezifität der routinemäßig eingesetzten Testsysteme spricht.

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 77 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 # 1125342 erhalten werden konnte, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, durchwegs korrekt.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu lato Genospezies, die speziell in Europa 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 im letzten Ringversuch die analytische Sensitivität der eingesetzten NAT-Testsysteme über die Aussendung einer Art Verdünnungsreihe von *B. afzelii* ermittelt wurde, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Abprüfung der analytischen Spezifität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *Borrelia lusitaniae* (# 1125354, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit einer etwas niedrigeren Menge an *Borrelia garinii* OspA Typ3, Stamm PBr (# 1125352, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL), eine Probe mit einer nennenswerten Menge an *Borrelia valaisiana* (# 1125353, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL) und eine Probe mit einer relativ hoher Menge *Leptospira interrogans* (# 1125351, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL).

Beginnen wir diesmal mit der "negativen Probe" # 1125351: sie wurde von nahezu allen Teilnehmern als korrekt negativ befundet. Dies deutet auf eine praxistaugliche 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.

Die positive Probe # 1125353 (*Borrelia valaisiana*, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL), wurde von 100 der insgesamt 107 Teilnehmer als positiv befundet. Fünf Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis und zwei Teilnehmer bewerteten diese Probe als "fraglich". Probe # 1125352 mit ca. 10^4 *Borrelia garinii* /mL konnte von 102 der insgesamt 107 Teilnehmer als positiv befundet werden und die restlichen 5 Teilnehmer beobachteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. In der Probe # 1125354 fand sich mit ca. 10^5 *Borrelia lusitaniae* /mL zwar die höchste Menge an Zielorganismen innerhalb des aktuellen Probensets - deren DNA konnte aber lediglich noch von 84 Teilnehmern mit ihren jeweiligen Borrelien-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig

detektiert werden. Ein falsch-negatives Ergebnis wurde hier von 19 Teilnehmern berichtet und 4 Teilnehmer bewerteten diese Probe als "fraglich". Drei der 19 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1125354 gaben dabei die Verwendung eines TaqMan *real-time* PCR Protokolls mit dem Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz an, von fünf 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. Aufgrund der heterogenen Ergebnislage bei Probe # 1125354 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal ausnahmsweise 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 oder eine der beiden anderen Proben als "negativ" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlaß nehmen, die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen Testsysteme zu überprüfen und sich gegebenenfalls die Limitationen der eingesetzten Testkonzepte hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu lato Genotypen bewußt machen. Im Gegensatz zu manch früheren Ringversuchen wurden aktuell keine Proben mit relativ geringen Mengen an Borrelien versandt. Die Herausforderung lag vielmehr auf der möglichst gleichmäßigen und zuverlässigen Erfassung unterschiedlicher Borrelien-Spezies.

Kommentar zum aktuellen Borrelien-PCR Ringversuch von Dr. Volker Fingerle und Prof. Dr. Dr. Andreas Sing (Nationales Referenzzentrum für Borrelien und Konsiliarlabor für Ehrlichien am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; Sollwertlabor für INSTAND e.V. Ringversuch RV 535). Erfreuliche Resultate des aktuellen Ringversuchs zum molekulargenetischen Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. waren zum Einen dass die *Leptospira interrogans* Probe nur von einem Teilnehmer fälschlicherweise als positiv erkannt wurde, zum Anderen dass *B. garinii* OspA-Typ 3 und *B. valaisiana* von jeweils mehr als 93% der Teilnehmer zuverlässig nachgewiesen wurden. Problematisch war dagegen der Nachweis von *B. lusitaniae*: Weniger als 80% der Teilnehmer haben diese Probe als positiv erkannt. Eigene Untersuchungen mit verschiedenen PCR-Protokollen bestätigen, dass der Nachweis dieser *B. burgdorferi* Genospezies häufig problematisch ist. Auch wenn die Humanpathogenität von *B. lusitaniae* kontrovers beurteilt wird – bislang existiert lediglich ein Humanisolat – sollte diese Spezies mittels PCR zuverlässig erkannt werden. Letztlich ist nicht auszuschließen dass der seltene Nachweis dieser Genospezies in Zentraleuropa zumindest zum Teil auf nicht ausreichend sensitive Nachweistechiken zurückzuführen ist. Da bzgl. der diagnostischen Relevanz der unterschiedlichen Genospezies erhebliche Unsicherheiten bestehen, an dieser Stelle eine kurze Übersicht zum *B. burgdorferi* sensu lato Spezies Komplex. Bislang wurden 18 diesem Komplex zugehörige Genospezies beschrieben, wovon aber lediglich fünf als gesichert humanpathogen gelten: *B. burgdorferi* sensu stricto – die einzige gesichert humanpathogene Spezies die auch in den USA vorkommt –, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* und *B. bavariensis*, letztere bis vor Kurzem als *B. garinii* OspA-Typ 4 klassifiziert. Dabei kann *B. garinii* zuverlässig noch in die OspA-Typen 3 und 5-8 subdifferenziert werden. Es ist zu betonen, dass sich in Deutschland alle humanpathogenen Spezies und OspA-Typen sowohl bei Zecken wie auch bei Patientenisolaten nachweisen lassen. Als fraglich humanpathogen gelten *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* und *B. bissettii* die alle in Einzelfällen entweder mittels molekulargenetischer Techniken und / oder Anzucht in Proben von europäischen Patienten nachweisbar waren. Für den auf NAT basierenden, zuverlässigen Nachweis von *B. burgdorferi* aus Patientenproben bedeutet dies, dass zumindest die angeführten acht Genospezies erfasst werden müssen. Speziell für den auf dem *ospA*-Gen basierenden Nachweis ist zu beachten, dass auch die verschiedenen *B. garinii* OspA-Typen sicher nachweisbar sein sollten. ---

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 (4x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (4x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (3x), Qiagen artus Borrelia LC PCR Kit (1x), EliGene *Borrelia* LC von Elisabeth Pharmacon (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), Dynex *B. burgdorferi* VL real time (1x) und *B. burgdorferi sensu lato* Real TM von Sacace (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

Eine 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 eine relativ stark positive Probe # 1125363, die mit einer Menge von ca. 10^6 CFU/mL an *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 versetzt war. Die Proben # 1125361 und # 1125362 des aktuellen Sets enthielten jeweils 10^5 CFU/mL an *Legionella gormanii* bzw. 10^4 CFU/mL an *Legionella micdadei*. Die „negative“ Probe # 1125364, die im aktuellen Probenset neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli* enthielt, wurde erfreulicherweise von 81 der insgesamt 84 Teilnehmern als negativ befundet. Dies spricht wieder einmal für ein erfreulich gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Die relativ stark positive Probe # 1125363 wurde diesmal von nahezu allen der insgesamt 84 Teilnehmer als positiv befundet. Die Probe # 1125363 des aktuellen Sets enthielt eine wirklich hohe Menge an Zielorganismen ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL *L. pneumophila* Serogruppe 1), die erfreulicherweise von 83 der insgesamt 84 Teilnehmer mit ihren NAT-gestützten Testsystemen zuverlässig nachgewiesen werden konnten. Lediglich ein Teilnehmer hatte offensichtlich Mühe, in dieser Probe *L. pneumophila* DNA zu detektieren und berichtete ein falsch-negatives NAT-Ergebnis. Angesichts der hohen Menge an *L. pneumophila* in diesem Probenmaterial steht wohl außer Frage, daß der betroffene Ringversuchsteilnehmer sein Probenaufbereitungsverfahren, die verwendeten Zielsequenzen und/oder NAT-Testsysteme mit offensichtlich unzureichender analytischer Sensitivität umgehend überprüfen und verbessern sollte.

Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielten 2 der 4 Proben (1125361 und # 1125362) diesmal eine nennenswerte Menge an *Legionella gormanii* bzw. *Legionella micdadei*. Bei der Mehrzahl der Teilnehmer führte dies erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen. Nur bei jeweils 9 der insgesamt 84 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier siebenmal die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls, zweimal der Einsatz von nicht näher spezifizierten BlockCycler Protokollen, sowie von einem Teilnehmer die Verwendung eines kommerziellen Testsystems mit dem *mip* Gen als *L.*

pneumophila-spezifische Zielsequenzen angegeben. Da sich sowohl *Legionella micdadei* als auch *L. gormanii* zumindest auf Ebene der 16S rDNA Sequenz jedoch in zahlreichen Nukleotidpositionen von *L. pneumophila* unterscheidet, sollten hier von den entsprechenden Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis die Annealingbedingungen sowie die Hybridisierungsregionen der verwendeten Primer und/oder Sonden überprüft und nachgebessert werden. Zumindest bei den 83 der insgesamt 84 Ringversuchsteilnehmern, die in der Zusammenschau der Ergebnisse für die *L. pneumophila*-positive Probe # 1125363 ein (richtig) positives Ergebnis berichtet haben, wurden die für die Proben # 1125361 und # 1125362 mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht streng mathematisch in die offizielle Bewertung für die Erteilung der Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** Eine vergleichbare Probenkonstellation war bereits im Ringversuch RV 536: *Legionella pneumophila* vom November 2009 gegeben. Dort haben wir ebenfalls versucht, über eine Probe mit der zum Zielorganismus eng verwandten Spezies *Legionella bozemanii* (vormals: *L. bozemanii*) die Spezifität der von den Teilnehmern eingesetzten Testsysteme abzutesten. Interessanterweise wurden damals von 8 der insgesamt 66 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse für die *L. bozemanii* Probe mitgeteilt und in diesem Zusammenhang ausschließlich die Verwendung von eigenentwickelten *L. pneumophila*-spezifischen Testsystemen angegeben. Offensichtlich haben nicht alle der betroffenen Laboratorien die falsch-positiven Ergebnisse im *Legionella pneumophila* PCR Ringversuch vom November 2009 oder auch vom November 2010 zum Anlaß genommen, ihre Testsysteme zu überprüfen und zu verbessern. Daher bleibt dem Ringversuchsleiter erneut zu hoffen, daß die Ergebnislage der letzten Ringversuche einen gewissen Ansporn für die betroffenen Teilnehmer darstellt und sie hinsichtlich der analytischen Spezifität ihrer eigenentwickelten Testsysteme etwas nachbessern. Denn es ist nicht auszuschließen, daß sich in einem der kommenden Ringversuchsrunden auch wieder die eine oder andere "non-pneumophila" Legionelle findet.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 32 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). 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 (7x), TibMolbiol LightMix *Legionella* (6x), AmpliGnost *L.pneumophila* kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (4x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (2x), Qiagen Artus *L. pneumophila* LC PCR Kit (2x), Mikrogen *Legionella* multiplex (1x), Dynex PnuemoPlex (1x), Minerva Onar Lp (1x), Argene Chlamylege (1x), und GeneProof LP PCR detection Kit (1x). Von den anderen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet und von keinem der insgesamt 84 Teilnehmer wurde bei dem aktuell versandten Probenset ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

Es wird auch weiterhin interessant sein zu verfolgen, inwieweit sich im Laufe der nächsten Ringversuchsrunden Unterschiede in der analytischen Sensitivität von selbstentwickelten und kommerziellen Testsystemen abzeichnen und in welchem Maße sich die hier erneut explizit adressierten Defizite bei der analytische Spezifität einiger eigenentwickelter NAT Testkonzepte verbessern lässt.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1125372; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^6$ CFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1125374; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1125371; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml), sowie eine Probe

ohne Zielorganismen (# 1125373), 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" # 1125373 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 8 Teilnehmern keine falsch-positiven Befunde und lediglich bei der etwas schwächer positiven Probe (# 1125371; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml) 3 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit wieder erfreulich hoch. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: IQ Check *Salmonella* II der Fa. Bio-Rad (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. So wie im Fall der Proben # 1125381 und # 1125384, die diesmal relativ hohe Mengen an *L. ivanovii* und *L. innocua* enthielten. Probe # 1125383 enthielt mit $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL eine geringe Menge an *L. monocytogenes*, die erfreulicherweise von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Im Gegensatz zu einigen der vorhergegangenen Ringversuche, bei denen durch die nahezu ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen bestimmte Proben bei keinem der Teilnehmer zu positiven Ergebnissen geführt hatte, wurde die Probe mit *L. ivanovii* diesmal zumindest von 4 der insgesamt 29 Teilnehmer als positiv für *Listeria* spp. DNA getestet und die Probe mit *L. innocua* von einem der insgesamt 29 Teilnehmer. Hintergrund dieser zumindest auf den ersten Blick etwas irritierenden Ergebniskonstellation in der statistischen Auswertung (Tabelle 2) ist die fast ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen, die keine selektive Detektion bzw. differenzierte Erfassung von non-*monocytogenes* Listerienspezies erlauben. Im Umkehrschluß spricht diese Datenlage dann für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme bei 23 der insgesamt 29 Teilnehmer. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein ***L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen

Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Von allen 29 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* (1x), AmpliGnost *L.monocytogenes* kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x) und Ingenetix Bacto Real *L.monocytogenes* (1x).

RV 539: MRSA

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

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs erfreulich kurz gehalten werden. Da wir diesmal 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, enthielt die Probe # 1125391 eine relativ hohe Menge eines sogenannten La-MRSA Isolats ("*Livestock-associated MRSA*", kurz: LaMRSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml). Probe # 1125393 enthielt einen PVL-positiven (!) Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (cMSSA; *mecA*-negativ, PVL-positiv; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). Probe # 1125392 enthielt eine Methicillin-sensiblen Koagulase-negative Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-negativ, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml). Die letzte der 4 Proben (# 1125394), enthielt neben humanem Zellmaterial nur eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Erfreulicherweise (und diesmal auch wieder "erwartungsgemäß") wurden für die eine MRSA-positive Probe # 1125391 von nahezu allen Teilnehmern positive Ergebnisse mitgeteilt. Lediglich ein Teilnehmer hatte sein Ergebnis bei Probe # 1125391 als "fraglich" und zwei Teilnehmer als MRSA-negativ klassifiziert. Auch die beiden MRSA-negativen Proben # 1125392 und # 1125394 wurden von jeweils 207 Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten MRSA-spezifischen Testsystemen als "negativ" getestet. Für die 6 falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 1125393 (PVL-positiver *S. aureus*) hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Die Annahme von isoliert auftretenden Kontaminationsereignissen mit MRSA DNA während der Probenaufbereitung oder Amplifikation bzw. Detektion sind hier wohl eher unwahrscheinlich. 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.

La-MRSA Isolate ("**Livestock-associated MRSA**", kurz: LaMRSA) werden derzeit hauptsächlich in Schweinebeständen, aber auch bei anderen Nutztieren beobachtet. Die mit dem zunehmenden Auftreten solcher La-MRSA Isolate verbundene Problematik wird in der aktuellen Literatur sowohl unter infektiologischen als auch epidemiologischen Gesichtspunkten diskutiert und hat mittlerweile auch schon in die MRSA-Screeningkriterien (Definition von "Risikopatienten") Einzug gefunden. Literaturstellen wären hier beispielsweise: Köck et al., 2011, Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones. *J Hosp Infect.* 79:292-296, oder: Köck et al., 2009, Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 28:1375-1382.

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 53 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: HAIN Genotype *Staphylococcus* (3x), HAIN GenoQuick MRSA (2x), HAIN Genotype MRSA (2x), TibMolbiol LightMix (2x), MRSA combi Assay von Autoimmun Diagnostika (1x), MRSA Plus der Fa. Congen (1x) und Minerva Onar MRSA (1x).

RV 540: *Chlamydia pneumoniae*

Eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Chlamydia pneumoniae* DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien erfolversprechend 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.

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 drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1125402; *C.*

pneumoniae, $\sim 1 \times 10^5$ IFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1125401; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit sehr geringer Menge (# 1125403; *C. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1125404; nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen).

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 etwas stärker positiven Proben (# 1125402 und # 1125401 sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Erfreulicherweise wurde für die negative Probe # 1125404 (nichtinfizierte Zellkultur und *E. coli*) lediglich von einem der insgesamt 93 Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis berichtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Selbst bei der schwach-positiven Probe # 1125403 mit ca. 10^3 IFU/ml *C. pneumoniae* konnten noch 86 der insgesamt 93 Teilnehmer den erfolgreichen DNA-Nachweis von *C. pneumoniae* aus dem Probenmaterial führen.

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. 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 (5x), GenProof *C. pneumoniae* PCR Kit (2x), Diagenode *Mycoplasma/Chlamydochila pneumoniae* Real Time PCR (2x), BD Probe Tec *Chlamydia* spp. (1x), Dynex PneumoPlex (1x), AmpliGnost *C.pneumoniae* kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (7x), TibMolbiol LightMix (1x), *Mycoplasma/Chlamydochila pneumoniae* PCR der Fa. Mikrogen (1x) und Argene Chlamydege (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.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal nur eine positive Probe: Probe # 1125412 wurde mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) versetzt. Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielten Probe # 1125411 und Probe # 1125414 diesmal nennenswerte Mengen an *M. orale* und *M. genitalium* als zu dem Zielorganismus verwandte Spezies (beide mit $\sim 1 \times 10^3$ Genomkopien/mL), was bei der Mehrzahl der Teilnehmer erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Zudem befand sich im Ringversuchsprobenset eine Probe ohne Zielorganismen (# 1125413), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt.

Insgesamt betrachtet wurden im Rahmen der aktuellen Probensets von den Teilnehmern wieder relativ hohe Richtigkeitsquoten erzielt. So konnten diesmal 99 der insgesamt 101 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae* Zielorganismen in der positiven Probe # 1125412 problemlos und zuverlässig nachweisen.

Mit Ausnahme von 2 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis bei Probe # 1125411 (*M. orale*), 2 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis bei Probe # 1125414 (*M. genitalium*) und einem Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei der negativen Probe # 1125413 (*E. coli*), wurden von den teilnehmenden Laboratorien durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet.

Wie bereits bei einigen der vorhergegangenen Ringversuche ausgeführt, sollte ein falsch-positives Ergebnis bei den *M. genitalium* bzw. *M. orale* Proben den entsprechenden Teilnehmern Anlaß zur kritischen Überprüfung des jeweiligen Testsystems geben. Auch wenn es sich hier um einen relativ neu eingeführten Ringversuch handelt und umfassende Erfahrungswerte aus früheren Ringversuchsrunden noch fehlen, so zeigt die Auswertung der Ergebnisse bereits deutlich auf, daß auch die Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA relativ hoch zu sein scheint (siehe Tabelle 3). Lediglich bei 3 der insgesamt 101 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen, die im Ergebnisformular als "in-house PCR assay" oder "Andere" klassifiziert wurden. Unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls angegeben. Obwohl sich *M. genitalium* und *M. orale* auf Ebene der 16S rDNA Sequenz deutlich von *M. pneumoniae* unterscheidet, sollten die Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis überlegen, eine geeigneter Zielsequenz zu wählen oder eine Sequenzierung eines positiven Amplifikationsproduktes zur Spezifitätsüberprüfung anschließen. Das für das P1-Adhäsion kodierende Gen hat mit dem MgPa Gen von *M. genitalium* gemeinsame Sequenzbereiche, sodaß die Annotierung bzw. Primerauswahl bei Verwendung dieser Zielsequenz geprüft werden sollte (siehe Literatur am Ende des Artikels).

Die im Rahmen dieser Ringversuchsserie mit eigenen Codenummern aufgeführten kommerziellen Testsysteme TIB Molbiol LightMix *M. pneumoniae* (10 Teilnehmer), Qiagen *M. pneumoniae* LC PCR Kit (5 Teilnehmer), sowie Minerva Venor Mp (3 Teilnehmer) konnten erfreulicherweise erneut mit durchwegs korrekten Ergebnissen und hohen Richtigkeitsquoten überzeugen. Da müssen zukünftig manche Teilnehmer mit eigenentwickelten (in-house) Testsystemen wohl noch etwas nachziehen. Die diagnostische Performance eines etablierten in-house Protokolls und ausgewählter kommerzieller NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae* DNA wurde kürzlich 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 Bakterien von Autoimmun Diagnostika (5x), BD Probe Tec (2x), AmpliGnost *M. pneumoniae* kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Kit (2x), Minerva Venor Mp (2x), Argene Chlamydege (1x), Diagenode *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* Real Time PCR (1x), Dynex PneumoPlex (1x), *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* PCR der Fa. Mikrogen (1x), und *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* Real TM von Sacace (1x).

RV 542: *Coxiella burnetii*

Dieser vor kurzem 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: zwei Proben mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (# 1125421 und # 1125423; *Coxiella burnetii*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL) und eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1125424; *C. burnetii*, $\sim 1 \times 10^2$ Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1125422), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Die beiden relativ stark positiven Proben # 1125421 und # 1125423 wurden von allen der insgesamt 15 Teilnehmer als positiv befundet. Mit ca. 10^2 *C. burnetii* Genomkopien pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1125424 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 14 der insgesamt 15 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ein Teilnehmer berichtete hier ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis. Dieses Gesamtergebnis ist auch deshalb sehr hoch einzuschätzen, da noch im RV vom Frühjahr 2011 diese DNA-Konzentration nur von 50% der teilnehmenden Labore richtig erkannt wurde. 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. 10^2 Genomäquivalenten/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint und sich damit im Vergleich zum vorherigen Ringversuch noch mal um eine log-10-Stufe verbessert hat. Aufgrund der bekannten sehr geringen DNA-Menge in klinischen Proben von Q-Fieberpatienten, ist diese Entwicklung sehr gut. Somit stellt der *C. burnetii* NAT-Nachweis eine sinnvolle Ergänzung zum serologischen Antikörpernachweis, speziell in der frühen Phase der akuten Erkrankung dar. Die "negative" Probe # 1125422, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde von allen 15 Teilnehmern korrekterweise als negativ befundet.

RV 543: *Francisella tularensis*

Dieser vor kurzem neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Francisella tularensis*" ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Francisella tularensis* DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets 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: zwei Proben mit einer relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1125431 und # 1125433; *Francisella tularensis* subspecies *holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1125434; *F. tularensis* subspecies *holarctica*, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1125432), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Ähnlich wie bei dem zuvor diskutierten Coxiellen-Ringversuch haben auch hier alle der 13 Teilnehmer die positiven Proben # 1125431 und # 1125433 korrekterweise als positiv befundet. Probe # 1125434 enthielt mit ca. 10^3 Organismen pro mL eine etwa zehnfach geringere Menge an *F. tularensis*, deren DNA immerhin noch von 3 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *F. tularensis*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Eine ähnliche Ergebniskonstellation wurde übrigens auch im vorhergegangenen Ringversuch (April 2011)

beobachtet. Fünf der 8 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1125434 gaben dabei die Verwendung eines eigenentwickelten (*in-house*) PCR assays mit *tul4/lpnA* Gen als Zielsequenz an, von zwei Teilnehmer wurde die Verwendung des *fopA* Gens als Zielsequenz seines Testkonzepts aufgeführt. Die "negative" Probe # 1125422, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurde von allen bis auf einen Teilnehmer 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 der geringer 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 Analysesysteme für den Nachweis von *F. tularensis* DNA mit einer Menge von ca. 10^3 Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint. 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.

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 2 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 der Probe # 1125434 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.

November 29, 2011

To the participants of the
INSTAND 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", 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", 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"

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:

NOVEMBER 2011

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

The current set of QC samples contained two samples with almost identical amounts of *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL; sample # 1125302 and sample # 1125304), two samples with almost identical amounts of *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^4$ CFU/mL; sample # 1125301 and sample # 1125304), and one sample without *C. trachomatis* or gonococci (# 1125303).

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 1 false-positive and 4 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 3 participants for sample # 1125301 which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of $\sim 10^4$ CFU/mL. For sample # 1125304, which contained an identical amount of *N. gonorrhoeae* target organisms, false-negative GO-results were reported by 14 participants. The apparently weaker analytical sensitivity of the PCR/NAT assays could be explained by the simultaneous presence of *C. trachomatis* in the latter sample.

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. By the way, we are currently evaluating technical strategies to end up with stabilized RNA target molecules in the complex sample matrix of our EQAS panles.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two samples with *C. trachomatis* target organisms (# 1125311 and # 1125312) with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml and two samples without target organisms (# 1125313 and # 1125314) containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*.

As depicted in table 2 of statistical analysis, false-negative results for samples # 1125311 and # 1125312 (each sample contained 10^3 IFU/ml of *C. trachomatis*) were reported by one and by 5 of the 121 participants, respectively. False-positive results for the negative samples were only reported by one participant for sample # 1125314. 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 121 participants of the current distribution.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained only one sample with a very high amount of *Bordetella pertussis* (# 1125324; 1×10^6 CFU/mL of target organisms), as well as three "negative" samples containing bacterial species closely related to the target organism: *Bordetella parapertussis*

(sample # 1125321 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL); *Bordetella holmesii* (sample # 1125322 with $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL); and *Bordetella bronchiseptica* (sample # 1125323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only one of the 115 participants reported a false-negative result for the strongly positive *B. pertussis* sample # 1125322 ($\sim 10^6$!! CFU/mL). The *B. parapertussis* sample was tested false-positive by 9 participants, the *B. bronchiseptica* sample by 3 participants and the *B. holmesii* sample was tested false-positive by 105 of the 115 participants. Since it is well known that *B. holmesii* strains may contain copies of the most popular *B. pertussis*-target gene IS 481, the high rate of false-positives is not really surprising for the latter sample. Considering that the detection rate of the *B. pertussis* sample # 1125322 was very high (indicating a good performance of the *B. pertussis*-specific PCR/NAT assays), and IS481 is still one of the most practical and sensitive target genes, we have not scored those (false) positive results for the *B. holmesii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. For colleagues who are interested in the IS481 topic, there is a very recent paper: Njamkepo et al., Significant finding of *Bordetella holmesii* DNA in nasopharyngeal samples from French patients with suspected pertussis. *Clin Microbiol.*, Dezember 2011, p. 4347-4348.

However, for participants who have observed false-positive results with samples # 1125321 and # 1125323, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. All of the remaining results reported by the 114 participants were correct. Run controls were performed by 113 participants and inhibition events were only observed by one participant with sample # 1125323 of the current distribution

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained only one positive sample (# 1125331) with approximately 10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strain, isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study. The other three samples contained culture suspensions of the related species *Helicobacter salomonis* (# 1125332; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), *Helicobacter bizzozeronii* (# 1125333; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml), and *Helicobacter felis* (# 1125334; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml).

Nearly all of the 41 participants reported a positive result for sample # 1125331 and the other three samples of the current set tested negative in the *H. pylori*-specific PCR assays of at least 33 from the 41 participants. However, for participants who have observed false-positive results with the related species *Helicobacter salomonis*, *H. bizzozeronii* and/or *H. felis*, it is recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. Except the observed cross-reactions of some PCR/NAT-assays, 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 of the 41 participants, and they were all correct.

RV 534: EHEC / STEC

The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1125341 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/ml, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-negative, *eae*-negative and *hlyA*-negative) and # 1125342 (*E. coli*, 1×10^3 CFU/ml, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*₂-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive). The other two EHEC-negative samples contained a *Salmonella enteritidis* strain (# 1125343; 1×10^4 CFU/ml), and an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1125344). Overall, there was a pretty good diagnostic performance of the EHEC-specific assays used by the 77 participants and only one false-positive result was observed for sample # 1125344 (presumably a sporadic contamination issue). One false-negative result was reported for strongly positive sample # 1125341 (EHEC, 1×10^5 CFU/ml) and 4 false-negative results were observed for the weak positive sample # 1125342 (EHEC, 1×10^3 CFU/ml) among the results reported by 77 participants.

The EHEC-negative sample # 1125343 tested negative by all of the participating laboratories. 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 distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia garinii* (# 1125352; ~1x10⁴ organisms/mL), one sample with *Borrelia valaisiana* (sample # 1125353; ~1x10⁴ organisms/mL), and one sample with *Borrelia lusitaniae* (# 1125354; ~1x10⁵ organisms/mL). Sample # 1125351 contained no *Borrelia* organisms but a strain of *Leptospira interrogans*.

With the exception of 5 false-negative results for sample # 1125352 (*Borrelia garinii*), 5 false-negative results for sample # 1125352 (*Borrelia valaisiana*) and one false-positive result for sample # 1125351 (*Leptospira interrogans*), the *B. burgdorferi*-specific assays of the participants worked well for three of the four samples of the current QC panel. Inclusion of a sample containing high numbers of *B. lusitaniae* organisms (# 1125354) was intentional to survey the analytical specificity of the various *Borrelia burgdorferi*-specific NAT assays currently applied in the diagnostic laboratories. The results depicted in table 2 clearly demonstrate the weakness of some assay concepts with respect to an equal coverage of all relevant *Borrelia* species. Correct positive results were only observed in 84 laboratories, whereas the *Borrelia burgdorferi*-specific NAT assays of 19 participants failed to detect the huge number of *Borrelia* DNA in sample # 1125354. By the way, we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. But especially those participants who have observed false-negative results with *B. lusitaniae* organisms in sample # 1125354 should consider to initiate appropriate measures to improve the analytical sensitivity of their assay concepts for a broader range of *Borrelia* genospecies known to be pathogenic for humans.

Comment of Dr. Volker Fingerle (German Reference Center for *Borrelia*, Oberschleißheim, Germany): our own investigations, including the evaluation of different PCR-protocols, also revealed that detection of *B. lusitaniae* species can be problematic. Though the human pathogenic potential of *B. lusitaniae* is not assured so far, reliable NAT assays should at least be able to detect this species. Possibly the rare detection of this species from clinical material might be in part caused by an insufficient analytical sensitivity of currently applied NAT protocols. In this context, we provide here a short overview on what is actually relevant regarding *B. burgdorferi* genospecies: 18 different genospecies belonging to the *B. burgdorferi* sensu lato genospecies complex were delineated so far. Only five of this genospecies are classified as pathogenic for humans, namely *B. burgdorferi* sensu stricto – the only assured human pathogenic species present in the USA -, *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* and *B. bavariensis*. The human pathogenic potential of *B. valaisiana*, *B. lusitaniae* and *B. bissettii* is not proven yet, though all of them were detected from clinical material in single cases. Taken together, reliable NAT protocols should provide sensitive detection of all eight species that are assured or possibly involved in human disease. For *ospA*-gene based detection, the different *B. garinii* *OspA*-types should be covered.

Run controls were performed by 104 participants and inhibition events were only observed by two participants with sample # 1125354 of the current distribution. In addition, only one of the 107 participants reported a false-positive result for the "negative" sample # 1125351 (*Leptospira interrogans*). Compared to the results observed during some of our previous RV 535 distributions,

this fact is highly appreciated since it indicates a significant improvement with respect to the prevention of intra-laboratory or intra-assay contamination events.

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* (4x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (4x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (3x), Qiagen artus *Borrelia* LC PCR Kit (1x), EliGene *Borrelia* LC from Elisabeth Pharmacon (1x), EliGene *Borrelia* RT from Elisabeth Pharmacon (1x), Dynex *B. burgdorferi* VL real time (1x) and *B. burgdorferi sensu lato* Real TM from Sacace (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

The current set of QC samples contained only one positive sample with *Legionella pneumophila* serogroup 1 (# 1125363; $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL), as well as two samples containing *Legionella gormanii* (# 1125361; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and *Legionella micdadei* (# 1125362; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1125364 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. With the exception of one false-negative result for sample # 1125363 the *L. pneumophila*-positive sample was tested positive by 83 of the 84 participating laboratories. As expected, a higher number of "false-positive" results were observed in the current QC distribution with the samples containing significant amounts of *Legionella gormanii* (# 1125361) and *Legionella micdadei* (# 1125362) - species closely related to the target organism *L. pneumophila*. It is good to see that 40 of the participants using "commercial assays" reported (correct) negative results for the *L. gormanii* and *L. micdadei* samples. At least for the 83 participants, who have submitted correct results for the *L. pneumophila*-positive sample # 1125363, we have not scored a (false) positive result for either the *L. gormanii* or *L. micdadei* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who observed such a cross-reaction with their in-house assays and are aiming at a high analytical performance should consider to improve the sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. False-positive results observed for the "negative" sample # 1125364 by three participating laboratories are presumably due to contamination events (originating by the highly positive sample in "previous position" of consecutive order). However, it seems that most of the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent such 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 a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Typhi: sample # 1125372 contained 5×10^6 CFU/ml, sample # 1125374 contained 5×10^5 CFU/ml and sample # 1125371 contained 5×10^4 CFU/ml. Sample # 1125373 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. The discussion of the PCR results reported by the 8 participants of the current distribution is very concise: only three false-negative results were reported for the weak positive sample # 1125371, no false-negative results were reported for the other 2 QC samples and no cross-reactions with the *E. coli* strain were observed. 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 (# 1125382; only *E. coli* cells), one sample positive for *L. monocytogenes* (# 1125383) and two samples with *Listeria ivanovii* (# 1125381) and *Listeria innocua* (# 1125384) as *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. Relatively high numbers of *L. monocytogenes* cells ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL) were present in sample # # 1125383, and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays applied by all participants. As the negative sample # 1125382 was reported negative by all of the participating laboratories, it seems that participants have implemented functional precautions to prevent such deleterious contamination events. In order to

assess the analytical specificity of the NAT assays currently used at the participating laboratories, we decided to include also some *Listeria* species other than *L. monocytogenes*. The sample positive for *Listeria ivanovii* (# 1125381) tested positive with the PCR/NAT assays of 4 participants, whereas the sample spiked with significant amounts of *Listeria innocua* (# 1125384) tested positive with the PCR/NAT assays of only one participant.

It should be noted, however, that the majority of participants have used *L. monocytogenes*-specific PCR/NAT-assays to analyze the samples of the *Listeria* spp. panel. 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 also 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.

Sample # 1125391 of the current set contained **La-MRSA** organisms (so called "*Livestock-associated MRSA*", PVL-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml). With the exception of 2 participants, who reported a false-negative result and 1 participant, who reported a "questionable" result for sample # 1125391, this MRSA positive sample was tested positive by all of the participants. Sample # 1125393 contained a methicillin-susceptible but PVL-positive *S. aureus* isolate (cMSSA, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml). Next to 201 (correct) negative results, 6 false-positive results were reported for this sample. Sporadic contamination events in the course of sample preparation and testing can not be ruled out, but are unlikely in this case. To make a short and easy story complete, MRSA-negative sample # 1125394 of the current set (which contained only *E. coli* and human cells) and sample # 1125392 (which contained a clinical isolate of a methicillin-susceptible CoNS strain, *mecA*-negative, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), were tested correctly negative by 207 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.

The awareness about **La-MRSA (livestock-associated MRSA)** has significantly increased over the past few years and is reflected in the current literature. Screening campaigns are leading to more reliable data about the local prevalence and the rising number of studies about the clinical impact and epidemiology of La-MRSA strains may support their relevance in the years to come. Here are just some suggestions for further reading on this topic: Köck et al., 2011, Characteristics of hospital patients colonized with livestock-associated methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) CC398 versus other MRSA clones. J Hosp Infect. 79:292-296, or: Köck et al., 2009, Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 28:1375-1382.

Except the minor issue with 7 false positive MRSA results in the MSSA sample # 1125393, 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 53 of the 208 participating laboratories - all laboratories correctly classified the cMSSA strain in sample #1125393 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 a kind of dilution series of *C. pneumoniae* organisms in the sample matrix: sample # 1125402 contained about 1×10^5 CFU/mL, sample # 1125401 about 1×10^4 organisms/mL and sample # 1125403 about 1×10^3 organisms/mL of *C. pneumoniae*-positive human cells. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1125404 of the current set. As depicted in table 2, no false-negative results were observed for the positive sample # 1125401 (10^4 IFU/mL) and only 2 false-negative results were observed for the tenfold higher (!) positive sample # 1125402 (10^5 IFU/ml). Even the weak-positive sample # 1125403 (10^3 IFU/mL) was found positive by the PCR/NAT assays applied in 86 of the 93 participating laboratories.

Since only one false-positive result was observed for the "negative" sample # 1125404, 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 541: *Mycoplasma pneumoniae*

General note to our participants: the concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of *M. pneumoniae* in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing typical clinical samples like BAL or other respiratory materials. So the lyophilized samples may contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components typically present in patient specimens. As a consequence, diagnostic assays designed for *M. pneumoniae* antigen detection in clinical specimens or other serological assays will fail due to the low number of *M. pneumoniae* infected cells in individual samples of the RV 541 distributions.

The current set of QC samples contained only one positive sample with a relative high amount of *M. pneumoniae* target organisms (# 1125412; $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL). Sample # 1125411 and sample # 1125414 were designed to monitor the analytical specificity of the assays currently used by the participating laboratories: these two samples contained a considerable amount of *M. orale*

($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL) and *M. genitalium* ($\sim 1 \times 10^3$ genome copies/mL) respectively as a related species to the target organism. The set was completed by sample # 1125413, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

As 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 *Mycoplasma pneumoniae*-specific results reported by 101 participants for the strong positive sample # 1125412, only 2 false-negatives were observed. Since only one false-positive result was observed for the "negative" sample # 1125413, it seems that the participating laboratories have implemented functional and efficient precautions to prevent deleterious contamination events. The remaining two samples # 1125411 (*M. orale*) and # 1125414 (*M. genitalium*) contained significant amounts of bacteria closely related to the target organism - they were tested negative by 99 of the 101 participants, respectively. False-positive results for the latter samples are presumably due to intralaboratory cross-contamination events and/or analytical specificity issues with the corresponding PCR/NAT-based assays. At least for the 99 participants, who have submitted correct results for the *M. pneumoniae*-positive sample # 1125412 and for negative sample # 1125413, we have not scored a (false) positive result for the *M. genitalium* / *M. orale* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who observed such a cross-reaction with their *in-house* assays and are aiming at a high analytical performance should consider to improve the sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. It should further be mentioned that 26 of the 28 participants, who indicated the use of the following commercial *M. pneumoniae*-specific PCR/NAT assays, obtained correct results for all samples of the current distribution: CAP Bakterien from Autoimmun Diagnostika (5x), BD Probe Tec (2x), AmpliGnost *M. pneumoniae* kit from Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Kit (2x), Minerva Venor Mp (2x), Argene Chlamylege (1x), Diagenode *M./C. pneumoniae* Real Time PCR (1x), Dynex PneumoPlex (1x), *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* PCR from Mikrogen (1x), and *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* Real TM from Sacace (1x).

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 clinical 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: sample # 1125421 and # 1125423 contained about 1×10^4 genome copies/mL, and sample # 1125424 about 1×10^2 genome copies/mL. A relatively high amount of *C. burnetii* organisms were present in samples # 1125421 and # 1125423, which consequently were tested positive by all of the 15 participating laboratories. Sample # 1125424, which contained an approximately hundred-fold lower number of *C. burnetii* target organisms per mL, was still tested "positive" by 14 of the 15 participants. One participant classified his result as "questionable". In comparison to the first proficiency testing earlier this year, where only half of the participating laboratories identified this DNA concentration correctly, this is an excellent improvement. This new level of sensitivity correlates very well with the usually observed DNA amounts in clinical materials from Q fever patients. It supports also the application of *C. burnetii* NAT-based assays as an additional method to the serological antibody detection, especially in the very early phase of an acute Q fever. Otherwise, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed. Sample # 1125422 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.

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: samples # 1125431 and # 1125433 contained about 1×10^4 CFU/mL, and sample # 1125434 was spiked with about 1×10^3 organisms/mL. With the exception of eight false-negative results and two "questionable" results for the (very weak) positive sample # 1125434, the three samples containing various amounts of *Francisella tularensis* subspecies *holarctica* DNA were tested positive by 12 of the 13 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 sample, we have not scored a (false) negative result for sample # 1125434 in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who have missed the target organisms in sample # 1125434 but are aiming at a very high analytical performance should consider to improve the sensitivity of their individual assay concepts. Since almost no false-positive results (1/13) were observed for the "negative" sample # 1125432, it seems that most of 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) November 2011**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125301	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1125302	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1125303	∅ / ∅	64	<i>Escherichia coli</i> K12
1125304	+ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)

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>				
	1125301	1125302	1125303	1125304	1125301	1125302	1125303	1125304	
Befund Result									
Positiv CT	0	139	0	12	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	1	0	0	126	nein / no	141	141	141	141
Positiv GO	137	0	0	0	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	3	2	141	2					
Fraglich / questionable	0	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.*

NAT-Methode [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 = 7)	13	13 / 21	62	7	7 / 7	100
LightMix CT/NG [21] (n = 12)	35	35 / 36	97	12	12 / 12	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 21)	60	60 / 63	95	21	21 / 21	100
COBAS Amplicor [23] (n = 13)	39	39 / 39	100	13	13 / 13	100
BD ProbeTec [24] (n = 19)	57	57 / 57	100	19	19 / 19	100
Artus CT [25] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 27)	81	81 / 81	100	27	27 / 27	100
Other commercial tests [27] (n = 40)	111	111 / 119 §	93	40	40 / 40	100
In house PCR assay [28] (n = 20)	58	58 / 59 §	98	20	20 / 20	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100

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 (nur CT) [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 = 7)	19	19 / 21	90	7	7 / 7	100
LightMix CT/NG [21] (n = 12)	36	36 / 36	100	12	12 / 12	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 21)	63	63 / 63	100	21	21 / 21	100
COBAS Amplicor [23] (n = 13)	39	39 / 39	100	13	13 / 13	100
BD ProbeTec [24] (n = 19)	57	57 / 57	100	19	19 / 19	100
Artus CT [25] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 27)	81	81 / 81	100	27	27 / 27	100
Other commercial tests [27] (n = 40)	117	117 / 119 §	98	39	39 / 40	98
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 20)	58	58 / 59 §	98	19	19 / 20	95
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	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.

Tabelle 5: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde. Hier sind nur die Ergebnisse für *Neisseria gonorrhoeae* dargestellt.

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

NAT-Methode (nur GO) [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 = 7)	14	14 / 21	67	7	7 / 7	100
LightMix CT/NG [21] (n = 12)	35	35 / 36	97	12	12 / 12	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 21)	60	60 / 63	95	21	21 / 21	100
COBAS Amplicor [23] (n = 13)	39	39 / 39	100	13	13 / 13	100
BD ProbeTec [24] (n = 19)	57	57 / 57	100	19	19 / 19	100
Artus CT [25] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 27)	81	81 / 81	100	27	27 / 27	100
Other commercial tests [27] (n = 40)	112	112 / 120	93	40	40 / 40	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 20)	59	59 / 60	98	20	20 / 20	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	12	12 / 12	100	4	4 / 4	100

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen..

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125311	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1125312	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1125313	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1125314	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 121</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1125311	1125312	1125313	1125314		1125311	1125312	1125313	1125314
Befund <i>Result</i>									
Positiv	120	115	0	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	1	5	121	120	nein <i>no</i>	121	121	121	121
Fraglich <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.

NAT-Methode [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>	%
GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 24)	46	46 / 48	96	46	46 / 46	100
LightMix CT [21] (n = 2)	3	3 / 4	75	4	4 / 4	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 32)	64	64 / 64	100	63	63 / 64	98
COBAS AmpliCor [23] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	100
BD ProbeTec [24] (n = 16)	32	32 / 32	100	32	32 / 32	100
Artus CT [25] (n = 9)	17	17 / 17 [§]	100	18	18 / 18	100
Abbott CT/NG [26] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100
Other commercial tests [27] (n = 19)	38	38 / 38	100	38	38 / 38	100
In house PCR assay [28] (n = 13)	23	23 / 26	88	26	26 / 26	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.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125321	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1125322	∅	62	<i>Bordetella holmesii</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1125323	∅	62	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
1125324	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)

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

<i>n</i> = 115	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1125321	1125322	1125323	1125324	1125321	1125322	1125323	1125324	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	9	105 ¹⁾	3	114	n.d.	2	2	2	2
Negativ	106	9	111	1	nein <i>no</i>	113	113	112	113
Fraglich <i>Questionable</i>	0	1	1	0	ja <i>yes</i>	0	0	1	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.

NAT-Methode [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>	%
Other commercial tests [27] (n = 42)	42	42 / 42	100	80	80 / 125 [§]	64
In house PCR assay [28] (n = 69)	69	69 / 69	100	142	142 / 207	69
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	4	4 / 4	100	6	6 / 12	50

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

Comments: ¹⁾ Due to the well-known cross-reaction of *B. holmesii* in IS 481-specific PCR assays for *B. pertussis*, positive PCR results with sample # 1125322 were not rated as false-positive.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125331	++	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA mut. in 28S rDNA)
1125332	Ø	62	<i>Helicobacter salomonis</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1125333	Ø	62	<i>Helicobacter bizzozeronii</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1125334	(Ø)	62	<i>Helicobacter felis</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)

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

<i>n = 41</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1125331	1125332	1125333	1125334	1125331	1125332	1125333	1125334	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	40 ¹⁾	6	3	7 ²⁾	n.d.	0	0	0	0
Negativ	1	35	38	34	nein <i>no</i>	41	41	41	41
Fraglich <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.

NAT-Methode [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>	%
Ingenetix ClariRes Assay [26] (n= 3)	3	3 / 3	100	9	9 / 9	100
Commercial assay [27] (n = 12)	12	12 / 12	100	33	33 / 36	92
In house PCR assay [28] (n = 24)	23	23 / 24	96	60	60 / 72	83
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 2	100	5	5 / 6	83

Comments: ¹⁾ Twenty-nine of the 41 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. All reported results were correct.

²⁾ Positive PCR results with sample # 1125334 were not rated as false-positive in the course of issuing the corresponding QC certificates.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125341	++	61 / 71	EHEC (~1x10 ⁵ CFU/mL) (<i>stx-1</i> positive)
1125342	+	61 / 71,72,77,78	EHEC (~1x10 ³ CFU/mL) (<i>stx-1, stx-2, eae, hlyA</i>)
1125343	∅	62	<i>Salmonella enteritidis</i> (~1x10 ⁴ CFU/mL)
1125344	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>)

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

<i>n = 77</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1125341	1125342	1125343	1125344	1125341	1125342	1125343	1125344	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	76 ¹⁾	73 ¹⁾	0	1	n.d.	2	2	2	2
Negativ	1	4	77	76	nein <i>no</i>	75	75	75	75
Fraglich <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.

NAT-Methode [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>	%
GenoType EHEC (Hain) [20] (n = 14)	28	28 / 28	100	28	28 / 28	100
Hyplex EHEC [21] (n = 5)	10	10 / 10	100	10	10 / 10	100
Other commercial tests [27] (n = 7)	14	14 / 14	100	14	14 / 14	100
In house PCR assay [28] (n = 51)	97	97 / 102	95	101	101 / 102	99
Andere/ k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	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. .

Comments: ¹⁾ Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 71 laboratories. With the exception of two laboratories (who missed the *stx-1* gene in sample # 1125342), all reported results were correct.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125351	∅	62	<i>Leptospira interrogans</i> (~ 1x10 ⁵ organisms/mL)
1125352	++	61	<i>Borrelia garinii</i> , OspA Typ3, PBr (~1x10 ⁴ organisms/mL)
1125353	++	61	<i>Borrelia valaisiana</i> (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
1125354	+++	61	<i>Borrelia lusitaniae</i> (~ 1x10 ⁵ organisms/mL)

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

<i>n = 107</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1125351	1125352	1125353	1125354		1125351	1125352	1125353	1125354
Befund <i>Result</i>									
Positiv	1	102	100	84	n.d.	3	3	3	3
Negativ	106	5	5	19 ¹⁾	nein <i>no</i>	104	104	104	102
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	2	4	ja <i>yes</i>	0	0	0	2

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 <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>	%
artus <i>Borrelia</i> LC kit [20] (n = 19)	57	57 / 57	100	19	19 / 19	100
Demeditec GenFlow [21] (n = 10)	28	28 / 30	93	10	10 / 10	100
Other/commercial tests [27] (n = 19)	50	50 / 57	88	19	19 / 19	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 58)	151	151 / 168 [§]	90	57	57 / 58	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	2	2 / 6	33	2	2 / 2	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⁾ Negative PCR results with sample # 1125354 were not rated as false-negative in the course of issuing the corresponding QC certificates.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125361	∅	62	<i>Legionella gormanii</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1125362	∅	62	<i>Legionella micdadei</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1125363	+++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
1125364	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

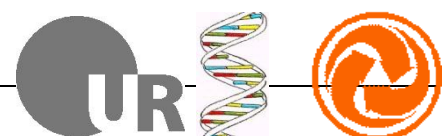
<i>n = 84</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
<i>Befund Result</i>	1125361	1125362	1125363	1125364	1125361	1125362	1125363	1125364	
Positiv	9 ¹⁾	9 ¹⁾	83	3	n.d.	1	1	1	1
Negativ	75	75	1	81	nein no	83	83	83	83
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	0	0	0	0

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.

NAT-Methode [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>	%
BD ProbeTec Legionella [26] (n = 1)	1	1 / 1	100	3	3 / 3	100
Other commercial tests [27] (n = 32)	32	32 / 32	100	93	93 / 96	97
In house PCR assay [28] (n = 49)	48	48 / 49	98	130	130 / 147	88
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	3	3 / 3	100	8	8 / 9	89

* 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.

Comments: ¹⁾ Cross-reactions with non-pneumophila *Legionella* species were (by way of exception) tolerated in the course of issuing the certificates. However, the participant who reported also a false-negative result for the *L. pneumophila* sample # 1125363, will not receive a certificate in the current round of EQAS.



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

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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125371	+	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhi (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
1125372	+++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhi (~ 5x10 ⁶ CFU/mL)
1125373	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1125374	++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhi (~ 5x10 ⁵ CFU/mL)

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

<i>n</i> = 8	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
Befund <i>Result</i>	1125371	1125372	1125373	1125374	1125371	1125372	1125373	1125374	
Positiv	5	8	0	8	n.d.	0	0	0	0
Negativ	3	0	8	0	nein <i>no</i>	8	8	8	8
Fraglich <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.

NAT-Methode [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>	%
Other commercial tests [27] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 7)	18	18 / 21	86	7	7 / 7	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.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125381	++	61 /72	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119
1125382	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1125383	+	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
1125384	+	61 /74	<i>Listeria innocua</i>

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

<i>n</i> = 29	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1125381	1125382	1125383	1125384		1125381	1125382	1125383	1125384
Befund <i>Result</i>									
Positiv	4	0	29	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	25 ¹⁾	29	0	28 ¹⁾	nein <i>no</i>	29	29	29	29
Fraglich <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 Anwenden 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 <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>	%
Artus <i>L. monocytogenes</i> [20] (n = 1)	1	1 / 1	100	3 ¹⁾	3 / 3	100
Other commercial tests [27] (n = 5)	15 ¹⁾	10 ¹⁾ / 15	66	5	5 / 5	100
In house PCR assay [28] (n = 22)	26	26 / 66	40	22	22 / 22	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100

Comments: ¹⁾ Due to the predominant use of *L. monocytogenes*-specific PCR assays, negative PCR results with sample # 1125381 and # 1125384 were not rated as "false negative".

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125391	+++	61 / 72	La-MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxa</i> ^R , PVL-neg) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1125392	∅	62 / 76	CoNS (<i>oxa</i> ^S) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1125393	∅	62 / 71,72	cMSSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxa</i> ^S , PVL-pos) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1125394	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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>			
	1125391	1125392	1125393	1125394		1125391	1125392	1125393	1125394
Befund <i>Result</i>									
Positiv	205	0	6	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	2	207	202	207	nein <i>no</i>	208	207	208	208
Fraglich <i>Questionable</i>	1	1	0	1	ja <i>yes</i>	0	1	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.*

NAT-Methode [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>	%
BD GeneOhm MRSA [20] (n=35)	35	35 / 35	100	105	105 / 105	100
GT MRSA Direct/ GQ MRSA [21] (n=39)	39	39 / 39	100	116	116 / 116 §	100
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=5)	5	5 / 5	100	15	15 / 15	100
LightCycler Kits [23] (n=2)	2	2 / 2	100	6	6 / 6	100
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=57)	57	57 / 57	100	171	171 / 171	100
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=22)	22	22 / 22	100	66	66 / 66	100
Commercial assay kit [27] (n=10)	9	9 / 10	90	25	25 / 29 §	90
<i>In house</i> PCR assay [28] (n=42)	41	41 / 41 §	100	123	123 / 126	98
Andere / k.A. / other [29] (n=9)	9	9 / 9	100	26	26 / 27	96

* 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⁾ A dedicated PVL / cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 53 laboratories. With the exception of three laboratories, all reported results were correct.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125401	++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
1125402	+++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)
1125403	+	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1125404	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 93</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1125401	1125402	1125403	1125404		1125401	1125402	1125403	1125404
Befund <i>Result</i>									
Positiv	93	91	86	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	2	6	92	nein <i>no</i>	93	93	93	93
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	1	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.

NAT-Methode [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>	%
LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n = 13)	38	38 / 39	97	13	13 / 13	100
Other commercial tests [27] (n = 27)	75	75 / 80 [§]	94	26	26 / 27	96
In house PCR assay [28] (n = 51)	151	151 / 153	99	51	51 / 51	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100

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

**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae*
 (RV 541) November 2011**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125411	∅	62	<i>Mycoplasma orale</i> (~ 1x10 ³ genome copies/mL)
1125412	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁵ gen. copies/mL)
1125413	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1125414	∅	62	<i>Mycoplasma genitalium</i> (~ 1x10 ³ genome copies/mL)

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

<i>n = 101</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1125411	1125412	1125413	1125414		1125411	1125412	1125413	1125414
Befund <i>Result</i>									
Positiv	2	99	1	2	n.d.	1	1	1	1
Negativ	99	2	100	99	nein <i>no</i>	100	100	100	100
Fraglich <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.

NAT-Methode [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>	%
LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 10)	9	9 / 10	90	30	30 / 30	100
Qiagen <i>M.pneumoniae</i> [21] (n = 5)	5	5 / 5	100	15	15 / 15	100
Minerva Venor Mp [22] (n = 3)	2	2 / 3	67	8	8 / 9	89
Commercial assay / kit [27] (n = 28)	27	27 / 28	96	82	82 / 84	98
In house PCR assay [28] (n = 53)	53	53 / 53	100	156	156 / 159	98
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.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125421	++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 ⁴ genome copies/mL)
1125422	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1125423	++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 ⁴ genome copies/mL)
1125424	(+)	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 ² genome copies/mL)

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

<i>n = 15</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1125421	1125422	1125423	1125424	1125421	1125422	1125423	1125424	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	15	0	15	14	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	15	0	0	nein <i>no</i>	15	15	15	15
Fraglich <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 Anwenden 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 <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>	%
LightMix <i>C. burnetii</i> [20] (n =1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100
In house PCR assay [28] (n = 14)	41	41 / 41 §	100	14	14 / 14	100

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

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1125431	++	61	<i>Francisella tularensis</i> holarctica (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1125432	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1125433	++	61	<i>Francisella tularensis</i> holarctica (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1125434	(+)	61	<i>Francisella tularensis</i> holarctica (~ 1x10 ³ CFU/mL)

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

<i>n</i> = 13	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
Befund <i>Result</i>	1125431	1125432	1125433	1125434	1125431	1125432	1125433	1125434	
Positiv	12	0	12	3	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	12	1	8 ¹⁾	nein <i>no</i>	13	13	13	13
Fraglich <i>Questionable</i>	1	1	0	2	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.

NAT-Methode [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>	%
LightMix <i>F. tularensis</i> [20] (n = 3)	7	7 / 9	78	3	3 / 3	100
Commercial assay / kit [27] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100
In house PCR assay [28] (n = 10)	20	20 / 27 [§]	74	9	9 / 9 [§]	100

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

Comments: ¹⁾ As sample # 1125434 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.