

	IN STAND 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) sowie dem BÄMI	IN STAND-Geschäftsstelle Ubierstr. 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 2. Juli 2012

RINGVERSUCHSAUSWERTUNG - Mai 2012

An die Teilnehmer

der IN STAND e.V. -Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(IN STAND-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 **18-25** 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 IN STAND-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. Spletstösser**

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 14 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „highlights“: so wurden beispielsweise in zwei der 4 Einzelproben des **RV 534** der stx-2 positive Stamm vom deutschen **EHEC-Ausbruchsgeschehen** im Mai 2011 eingebracht. Mein lieber Kollege, Herr Dr. Matthias Pulz (Präsident des Niedersächsischen Landesgesundheitsamts, Hannover) hat uns diesen Stamm letztes Jahr dankenswerterweise bereits in der Frühphase des Ausbruchsgeschehens für Zwecke der Qualitätssicherung zur Verfügung gestellt. Als weiteres "highlight" innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539** ein **PVL-positives MSSA Isolat** ausgesandt.

Angesichts der beiden Milzbrandfälle bei Heroinkonsumenten aus dem Raum Regensburg, die wir in unserem Institut, sozusagen "unmittelbar vor Ort", sowohl kulturell isoliert, mittels real-time PCR identifiziert und in Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) auch molekular feintypisieren konnten, ist ab 2013 eine Erweiterung des Ringversuchs **RV 542** (Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetti*) um den Zielorganismus **Bacillus anthracis** angedacht. Grund für die geplante Erweiterung des RV 542 war das überraschend große Interesse an geeigneten PCR-Protokollen und der Verfügbarkeit von entsprechendem Positivkontrollmaterial nach unserer gezielten Mitteilung an Fachkollegen (DGHM-Newsletter vom 21. Juni 2012 aus aktuellem Anlaß: "Anthrax in Blutkulturen nachgewiesen").

Und hier gleich noch eine Ankündigung für neue Ringversuche: Nach erfolgreicher Konfektionierung und Herstellung von Probenmaterial für einen Proberingversuch wird voraussichtlich ab der kommenden Ringversuchsrunde im November 2012 auch ein **RV 544** zum NAT-gestützten Nachweis von ***Pneumocystis jirovecii* DNA** eingeführt und ab 2013 in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen werden. An der Ringversuchsleitung wird hier meine liebe Kollegin Frau Dr. Ingrid Reiter-Owona, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP), Bonn, maßgeblich beteiligt sein.

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.

MAI 2012:

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 # 1215301 und # 1215303), sowie die positive Proben des RV 531 # 1215312, und 1215313), *Neisseria gonorrhoeae* (Proben # 1215302 und # 1215303), *Helicobacter pylori* (Probe # 1215333), *Legionella pneumophila* (Probe # 1215363) sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1215382).

Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen des stx-2 positiven EHEC Isolats vom Ausbruchsgeschehen im Mai 2011 in den Proben # 1215341 und # 1215343. 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 prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum "Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

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

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich 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 den drei unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter

Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit gleichen und relativ geringen Menge an *C. trachomatis* (#1215301 und #1215303, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL), und zwei Proben (#1215302 und #1215303) mit ca. 1×10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*. Probe #1215304 enthielt lediglich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* als bakterielle Komponente.

Auch wenn die beiden positiven Proben #1215301 und #1215303 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis* Zielorganismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 145 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 6 falsch-negative und 1 als fraglich klassifiziertes Ergebnis. 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 #1215303 (*C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae*; jeweils ca. 1×10^3 IFU bzw. CFU/mL) nur von 4 der insgesamt 145 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA mitgeteilt. In der anderen Probe (#1215302) befand sich mit 1×10^3 CFU/mL zwar eine nahezu identische Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen - hier konnten jedoch (interessanterweise) 30 der insgesamt 145 Teilnehmer keine Gonokokken DNA nachweisen und teilten somit 27 falsch-negative und 3 als "fraglich" klassifizierte Ergebnisse mit. Für diesen Effekt hat der Ringversuchsleiter auch keine naheliegende Erklärung.

Angesichts der mit 1×10^3 CFU/mL ehrlicherweise nicht als "äußerst gering" zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in Probe #1215303 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

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

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

Ich glaube es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar daß wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchsprobenmaterial für bestimmte Testsysteme bereitstellen können. Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten

Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Dies deutet zumindest indirekt auf ausreichend hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 145 Teilnehmern durchgeführt, Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, daß im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in 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 detaillierter 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 zugrunde liegen.

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche Cobas 4800 System (8x), TibMolbiol LightMix NG (7x), Hain GenoQuick CT (4x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (4x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (3x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (3x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (2x), Amplex Hplex STD (2x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), APTIMA Combo 2 Assay von Gen Probe (1x), BioRad DX CT/NG/MG Assay (1x) und BD ProbeTec (1x).

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

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchset enthielt diesmal zwei identische Proben mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1215312, und # 1215313 mit 10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1215311, und # 1215314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den beiden positiven Proben # 1215312 und # 1215313 lediglich von 7 der insgesamt 131 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bis auf 6 falsch-positive Ergebnisse (von insgesamt 5 unterschiedlichen Teilnehmern) wurden diesmal bei den negativen Proben # 1215311 und # 1215314 durchwegs richtig negative Ergebnisse berichtet und unter den insgesamt 524 mitgeteilten Ergebnissen wurde lediglich ein Ergebnis als "fraglich" klassifiziert.

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

Auch wenn mit 1×10^3 IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint,

sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität falsch-negative Ergebnisse Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor aktuellen Diskussion um das "pooling" von entsprechendem Untersuchungsmaterial gewinnt auch der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme zusätzlich an Bedeutung.

Inhibitionskontrollen wurden von nahezu allen Teilnehmern durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden dabei nur von einem Teilnehmer bei einer Einzelprobe 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 (2x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (2x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), Roche Cobas 4800 System (2x), CT/NG Assay von Cepheid (1x), APTIMA Combo 2 Assay von Fa. Gen Probe (1x), Hain GenoQuick CT (1x) und Artus *Chlamydia trachomatis* (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit einer hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 1215322 mit 10^5 CFU/mL und # 1215321 mit 10^3 CFU/mL an *B. pertussis*) sowie zwei Proben mit einem klinischen Isolat von *Bordetella bronchiseptica* als verwandte Spezies (# 1215323 und # 1215324).

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte diesmal sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten. Die *B. pertussis*-(stark)positive Probe # 1215322 sowie die beiden negativen Proben, die diesmal mit nennenswerten Mengen an *Bordetella bronchiseptica* versetzt waren (# 1215323 und # 1215324) wurden von nahezu allen der insgesamt 120 Teilnehmer korrekt befundet.

Falsch-negative Ergebnisse wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs lediglich von 6 Teilnehmern für die *B. pertussis*-(schwach)positive Probe # 1215321 (ca. 10^3 CFU/mL an *B. pertussis*) mitgeteilt.

Falsch-positive Ergebnisse wurden diesmal lediglich von je einem Teilnehmer bei den beiden negativen Proben # 1215323 und # 1215324 (*B. bronchiseptica*) beobachtet. Hierbei handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung oder, was bei der aktuellen Probenkonstellation am Wahrscheinlichsten erscheint, um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Aus diesem Grund sollten Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei den entsprechenden Proben versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Die 6 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei der *B. pertussis*-positiven Probe # 1215321 sollten jedoch intensiv daran arbeiten, die analytische Sensitivität ihrer jeweiligen Testsysteme zu verbessern.

Inhibitionskontrollen wurden von 118 der insgesamt 120 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei dem aktuellen Proben set von keinem Teilnehmer beobachtet.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 53 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz *IS481*, von 9 Teilnehmern die

Verwendung der 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: TibMolbiol LightMix BP (12x), Autoimmun Diagnostika CAP *B. pertussis* (8x), HAIN GenoQuick Bordetella (7x), GeneProof *B. pertussis* / *parapertussis* PCR Kit (5x), Mikrogen Diagenode *B. pertussis* / *B. parapertussis* kit (5x), *B. pertussis* / *B. parapertussis* von Cepheid (1x), Ingenetix Bacto Real Bordetella (1x), AmpliGnost *B. pertussis* / *parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (3x), RIDAGENE *Bordetella* (1x) und Attomol *Bordetella* DNA-LINA (2x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* Patientenisolats in einer Art Verdünnungsreihe. Eine der Proben enthielt relativ hohe Mengen an Zielorganismen (# 1215332; *H. pylori*, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), eine zweite Probe eine etwa zehnfach geringere Menge (#1215334; *H. pylori*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine dritte Probe eine etwa hundertfach geringere Menge (# 1215333; *H. pylori*, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL), und eine der vier Proben enthielt keine Zielorganismen (# 1215331), sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden etwas stärker positiven Proben # 1215332 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) und # 1215334 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) führte beim Nachweis von *H. pylori* DNA zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von zwei der insgesamt 43 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die positive Probe #1215334 und von 4 weiteren Teilnehmern ein falsch-negatives Ergebnis für die schwach-positive Probe # 1215333 ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) mitgeteilt.

Auch diesmal schnitten sowohl die kommerziellen, als auch die eigenentwickelten Testsysteme wieder erfreulich gut ab. Bis auf 18 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" 10 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 43 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 30 der insgesamt 43 Teilnehmer mitgeteilt, und diese waren diesmal auch erfreulicherweise durchwegs korrekt.

RV 534: EHEC / STEC

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen). Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei positiven Proben mit ca. 1×10^5 CFU/mL (# 1215341: *E. coli*, *stx*₂-positiv) und ca. 1×10^4 CFU/mL (# 1215343: *E. coli*, *stx*₂-positiv), eine Probe mit einer relativ geringen

Menge eines klinischen EPEC Isolats (# 1215342; *stx*₁- und *stx*₂- negativ, *eae*- positiv, *hlyA*-negativ), sowie eine Probe mit einem *E. coli* K12 Stamm (# 1215344; *eae*-, *hlyA*- negativ).

Im Rahmen des aktuellen EHEC-PCR/NAT-Ringversuchs haben wir in zwei der vier Einzelproben den *stx*-2 positiven Stamm vom deutschen EHEC-Ausbruchsgeschehen im Mai 2011 versandt. Ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Matthias Pulz (Präsident des Niedersächsischen Landesgesundheitsamts, Hannover), der mir diesen Stamm letztes Jahr bereits in der Frühphase des Ausbruchsgeschehens (kurz nach seiner ersten Pressekonferenz) in kollegialer Weise für unsere Qualitätssicherungsaktivitäten zur Verfügung gestellt hat.

Die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC führte hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten - sowohl für positive als auch für negative Befunde. Für die zwei falsch-positiven PCR-Resultate bei der EPEC Probe (# 1215342) gibt es keine naheliegenden Erklärungen - eventuell könnte man hier über eine fälschliche Klassifizierung des *eae*-Gens als Surrogatmarker für EHEC oder das Auftreten von Kontaminationsereignissen durch die benachbarte EHEC-positive Probe während der Probenaufreinigung und Prozessierung der PCR-Reaktionsansätze spekulieren. Interessanterweise waren von den falsch-negativen EHEC Ergebnissen bei den Proben # 1215341 und # 1215343 je ein Anwender mit *in-house* PCR-Assay und ein Anwender mit dem kommerziellen Testsystem (GenoType EHEC) betroffen. Von 27 der insgesamt 28 Teilnehmer mit letztgenanntem Testsystem (GenoType EHEC, Hain Lifescience) wurden übrigens durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet. So viel zu den "Unzulänglichkeiten" einer statistischen Auswertung in Tabelle 3, bei der Richtigkeitsquoten von weniger als 100 % nicht immer unmittelbar auf Schwächen des eigentlichen Testsystems hindeuten müssen...

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.

Nach wie vor gab die Mehrzahl der Teilnehmer die Verwendung von selbstentwickelten oder "anderen" kommerziellen Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an. Bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Zudem wurden von 103 der insgesamt 106 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 interpretierbares Ergebnis bei dem EPEC Isolat # 1215342 ermittelt 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 Genotypen, die zumindest außerhalb den Vereinigten Staaten von Amerika mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden, nach wie vor ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik. Diese Situation spiegelte sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider.

Nachdem die Probenauswahl des letzten Ringversuchs mehr auf die analytische Sensitivität der eingesetzten Testsysteme abzielte, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Abprüfung der analytischen Spezifität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben

enthielt eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia spielmanii* (# 1215351, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit einer hohen Menge an *Borrelia garinii* (# 1215352, $\sim 1 \times 10^5$ Organismen/mL), eine Probe mit einer nennenswerten Menge an *Treponema phagedenis* (# 1215353) sowie eine Probe, die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt (# 1215354)

Die beiden relativ stark positiven Proben # 1215351 und # 1215352 mit jeweils ca. 10^5 Zielorganismen pro mL Probenvolumen wurde diesmal von allen bis auf einen der insgesamt 110 Teilnehmer als positiv befundet.

Die "negative" Probe # 1215354, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *Treponema phagedenis* enthielt, wurden hier auch wieder von einem erfreulich hohen Anteil der Teilnehmer als negativ befundet. Lediglich zwei der insgesamt 110 Teilnehmer berichteten ein falsch-positives Ergebnis für *Borrelia burgdorferi* sensu lato DNA und zwei Teilnehmer klassifizierten ihr Ergebnis als "fraglich". Im Rahmen des diagnostischen workflows der beiden Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis hatten hier offensichtlich Kontaminationsereignisse während der individuellen Probenaufarbeitung stattgefunden oder es wurden Testsysteme mit mangelhafter Spezifität eingesetzt.

Die Probe # 1215354 des aktuellen Ringversuchs enthielt ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial. Hier wurden von 4 Teilnehmern falsch-positive Ergebnisse berichtet, wobei dies vermutlich ebenfalls durch laborinterne Kontaminationsereignisse oder eine mögliche Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung begründet sein dürfte.

Nach wie vor haben ungefähr die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; signifikante Inhibitionsereignisse 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* (5x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (4x), EliGene *Borrelia* LC 2 von Elisabeth Pharmacon (3x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (2x), Analytik Jena RapidSTRIP *Borrelia* assay (2x), Zecken Screening Kit von Autoimmun Diagnostika (2x), Immundiagnostik MutaGEL *Borrelia* (1x) und Ingenetix *Borrelia burgdorferi sensu lato sp.* Assay (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1215361; *L. pneumophila* Serogruppe 3, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1215364; *L. pneumophila* Serogruppe 3, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1215363; *L. pneumophila* Serogruppe 3, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1215362), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Die relativ stark positive Probe # 1215361 wurde diesmal von nahezu allen der insgesamt 90 Teilnehmer als positiv befundet. Probe # 1215364 enthielt mit ca. 10^4 Organismen pro mL eine etwa zehnfach geringere Menge an *L. pneumophila* SG 3, deren DNA immerhin noch von 86 Teilnehmern mit ihren jeweiligen *L. pneumophila*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Unter den Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis fanden sich TaqMan *real-time* PCR Protokolle mit dem *omp*-Gen als spezifische Zielsequenz, ein *in house* Protokoll unter Verwendung des *mip*-Gens sowie ein *nested* Block-Cycler PCR-Protokoll zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte.

Anmerkung: Im Rahmen des vorhergegangenen Ringversuchs im April 2011 wurde eine vergleichbare Probe mit ca. 10^4 Organismen pro mL *L. pneumophila* Serogruppe 1 nur bei 78 von insgesamt 94 Teilnehmern erfolgreich detektiert !

Mit ca. 10^3 *L. pneumophila* Serogruppe 3 Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1215363 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 65 der insgesamt 90 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ähnlich wie bei der Probe mit ca. 10^3 CFU/mL an *L. pneumophila* Serogruppe 1 (RV 536, April 2010; bei 50 von 77 Teilnehmern richtig-positiv getestet) und der Probe mit ca. 10^3 CFU/mL (RV 536, April 2011; bei 53 von 94 Teilnehmern richtig-positiv getestet), weist die aktuelle Ergebniskonstellation erneut darauf hin, daß die untere Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch gut evaluierten NAT-gestützten Analysesysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA mit einer Menge von ca. 10^3 Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1215363 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Ringversuchsteilnehmer, die auch die Probe # 1215364 (mit ca. 10^4 Legionellen pro mL) als "negativ" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlaß nehmen, die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen Testsysteme zu überprüfen oder sich gegebenenfalls deren technische Limitationen bewusst machen.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 39 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix *Legionella* (9x), Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (8x), LEGD-LC vom Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik, Karlsruhe (5x), GeneProof LP PCR detection Kit (3x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (2x), Mikrogen Diagenode Dia-Lpn-050 Kit (2x), Minerva biolabs MAST Onar Lp (1x), Ingenetix Bacto real *L. pneumophila* RT PCR Assay (1x), Argene Chlamylege (1x) und Nanogen *L. pneumophila* Q-PCR Alert kit (1x).

Von den anderen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet und von keinem der insgesamt 90 Teilnehmer wurde bei dem aktuell versandten Probenstet ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit relativ hoher Menge an *Salmonella enterica* ser. Typhimurium (# 1215373; $\sim 5 \times 10^5$ CFU/mL), eine Probe mit einer etwa

zehnfach geringeren Menge an *Salmonella enterica* ser. Enteritidis (# 1215371; $\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe zur Abprüfung der analytischen Spezifität (# 1215374, *Campylobacter jejunii*) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1215372), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthält.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Im Gegensatz zu manch früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen war diesmal kein falsch-positives Ergebnis bei der "negativen Probe" bzw. eine Kreuzreaktion der eingesetzten Testsysteme mit dem *Campylobacter jejunii* in Probe # 1215374 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 7 Teilnehmern nur ein falsch-negatives Ergebnis und keine falsch-positiven Ergebnisse mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit annähernd bei 100 %.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: xTAG-GPP multiplex PCR der Fa. Luminex (1x).

In enger Abstimmung mit unserem Sollwert-Laboratorium (Dr. U. Busch, Dr. U. 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 vier Proben mit einer relativ geringen Menge an Zielorganismen zu versetzen - auch wenn im Rahmen der gesetzlichen Vorschriften und/oder Richtlinien der einzelnen Fachgesellschaften derzeit noch keine genauen unteren Nachweisgrenzen für den NAT-gestützten Salmonellen-Nachweis festgelegt wurden.

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. Im aktuellen Ringversuch wollten wir uns jedoch auf die Abprüfung der analytischen Sensitivität konzentrieren, hierfür wurde eine Art Verdünnungsreihe von *Listeria monocytogenes* angefertigt. Probe # 1215381 enthielt eine relativ hohe Menge an *L. monocytogenes* ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL), die auch von allen der insgesamt 26 Teilnehmer korrekt erfasst wurde. Probe # 1215384 enthielt mit $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL eine etwa zehnfach geringere Menge an Zielorganismen, die ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit ca. 5×10^2 *L. monocytogenes* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1215382 diesmal eine sehr geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde selbst diese schwach-positive Probe von 25 der insgesamt 26 Teilnehmer als "positiv" klassifiziert. Lediglich ein Teilnehmer berichtete hier ein (falsch-) negatives Ergebnis - vermutlich wurde hier ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität eingesetzt.

Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1215383), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet.

Da wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben der derzeit technisch machbaren unteren Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns

dabei sehr wohl bewusst, daß bei vielen Fragestellungen das "technisch machbare" nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem "diagnostisch sinnvollen" ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte. Der möglichst selektiven Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-monocytogenes Listerienspezies werden wir uns wieder in einigen der zukünftigen Ringversuchsrunden widmen.

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

Von allen 26 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix *L. monocytogenes* (2x).

Bei diesem Ringversuch besteht explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein ***L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

RV 539: MRSA

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

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorangegangener 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 228 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 # 1215391 eine relativ hohe Menge eines typischen cMRSA Isolats (MRSA; PVL-positiv; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Probe # 1215393 enthielt einen PVL-positiven (!) Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (cMSSA; *mecA*-negativ, PVL-positiv; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Probe # 1215392 enthielt diesmal eine Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-negativ, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Die letzte der vier Proben (# 1215394), enthielt neben humanem Zellmaterial nur eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Auch wenn sich in der MRSA-positiven Probe # 1215391 eine relativ hohe Menge an entsprechenden Zielorganismen befand, so ist die diesmal beobachtete Richtigkeitsquote von 100

% als überaus respektabel zu bezeichnen. Erfreulicherweise wurden für diese Probe von allen 228 Teilnehmern korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt. Auch die drei MRSA-negativen Proben # 1215392, # 1215393 und # 1215394 wurden von jeweils 222, 224, bzw. 227 Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten MRSA-spezifischen Testsystemen als "negativ" getestet. Lediglich ein Teilnehmer hatte sein Ergebnis bei Probe # 1215393 und zwei Teilnehmer hatten ihre Ergebnisse bei Probe # 1215392 als "fraglich" klassifiziert. Für die drei falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 1215393 (PVL-positiver *S. aureus*) bzw. die vier falsch-positiven Ergebnisse bei Probe # 1215392 (CoNS) hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Die Annahme von isoliert auftretenden Kontaminationsereignissen mit MRSA DNA während der Probenaufarbeitung 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.

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 64 der insgesamt 228 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* (8x), TibMolbiol LightMix MRSA (1x), Gen ID MRSA Kit (1x), BD GeneOhm MRSA (1x), Cepheid GeneXpert (1x), und MRSA Plus der Fa. Congen (1x).

Klinische Relevanz von cMSSA Isolaten (Exkurs): Probe # 1215393 enthielt diesmal ein PVL-positives Methicillin-sensibles *Staphylococcus aureus* Isolat, das (zumindest derzeit) zugegebenermaßen nicht sehr häufig in der Routinediagnostik angetroffen werden dürfte. Als Beleg für die Tatsache, daß auch in unseren Breiten durchaus PVL-positive MSSA Stämme vorkommen und diese unter Umständen auch ein erhöhtes pathogenes Potential aufweisen können, hier der entsprechende **Fallbericht von Kollegen Dr. Jürgen Wenzel** (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Regensburg):

Das besagte Isolat wurde aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) eines **12-jährigen Jungen** isoliert. Der Patient erkrankte mit grippeähnlichen Symptomen und **verstarb noch am gleichen Tag** in einer Kinderklinik trotz maximaler intensivmedizinischer Versorgung an **einer fulminanten nekrotisierenden Pneumonie**. Post mortem gelang die kulturelle Anzucht und Identifizierung eines Methicillin-sensiblen, PVL-positiven *Staphylococcus aureus* (positiver PCR-Nachweis des *S. aureus*-spezifischen pSa442-Gens; PCR *mecA*-Gen negativ; positiver PCR-Nachweis des *LukS-PV* Gens). Die molekulare Feintypisierung ergab spa-Typ t044, MLST-Typ ST-80 und agr Gruppe 3, Typ R VI-A8. Interessanterweise lag eine respiratorische Koinfektion mit Parainfluenzavirus Typ 1 vor. Für interessierte Kollegen hier der Literaturverweis für den entsprechend ausführlicheren Case Report, der auch gerne über den Ringversuchsleiter als pdf-file angefordert werden kann: Wenzel JJ, Hentschel J, Silvis W, Permanetter W, Mattes J, Kochanowski B, Herterich R, Jilg W, Linde HJ (2009) Rapidly fatal necrotizing pneumonia in a 12-year-old boy caused by co-infection with parainfluenza virus type 1 and Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Infection* **37**:75-77.

Dies nur als weiterer Beleg für die Tatsache, daß jeder Ringversuchsteilnehmer auch einem MSSA Isolat mit ähnlichem pathogenen Potential beim routinemäßigen MRSA Screening begegnen

könnte – und es trotz auffälliger Klinik als solches vermutlich unerkant bleiben würde, solange die aufwendige molekularbiologische PVL-Testung im diagnostischen Ablaufschema eines mikrobiologischen Labors nur auf MRSA-Isolate beschränkt ist.

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal je zwei Proben mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1215403; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^6$ IFU/ml und # 1215401; *Chlamydia pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml), eine Probe mit *Chlamydia trachomatis* A (# 1215402), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1215404), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie auch schon in vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Den in Tabelle 2 aufgeführten Daten ist zu entnehmen, daß auch nahezu alle Teilnehmer die Zielorganismen in den beiden positiven Proben # 1215403 und # 1215401 sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Angesichts der mit 1×10^4 IFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als "äußerst gering" zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in Probe # 1215401 sollten falsch-negative Ergebnisse bei den betroffenen 3 Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Erfreulicherweise wurden für die Probe # 1215402 (*Chlamydia trachomatis* A) lediglich von drei der insgesamt 97 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet. Bei den falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung oder, was bei der aktuellen Probenkonstellation am Wahrscheinlichsten erscheint, um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Aus diesem Grund sollten Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei den entsprechenden Proben versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Bei der negativen Probe # 1215404 wurden von nahezu allen der 97 Teilnehmer durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Alle Teilnehmer haben entweder kommerzielle oder selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae* DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion bei den vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs wurde dabei von keinem der Teilnehmer beobachtet. Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der zumindest aus methodischer Sicht relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Im Rahmen des aktuellen

Ringversuchs wurde von 15 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix C. *pneumoniae* Testsystems angegeben (Code [21] auf dem Ergebnisformular) und sie konnten damit alle (bis auf einen Teilnehmer ?) eine Richtigkeitsquote von 100 %, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen.

Unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (6x), AmpliGnost C. *pneumoniae* PCR Kit vom Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik, Karlsruhe (6x), GenProof C. *pneumoniae* PCR Kit (4x), Immundiagnostik MutaPLATE C. *pneumoniae* (1x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma/Chlamyphila pneumoniae* Real Time PCR (6x), Bacto real C. *pneumoniae* RT PCR Assay der Fa. Ingenetix (1x) und Argene Chlamylege (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1215411 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL) und Probe # 1215413 mit eine etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL). Um die Spezifität der Testsysteme abzu prüfen, enthielt Probe # 1215412 diesmal eine relativ geringe Menge an *Ureaplasma urealyticum* - eine zum Genus der Zielorganismen Mycoplasma verwandte Spezies. Im Ringversuchsprobenstet befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1215414), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen und probenmaterialähnlichen Proteinkomponenten enthielt.

Insgesamt betrachtet wurden im Rahmen der aktuellen Probenstets von den Teilnehmern wieder erfreulich hohe Richtigkeitsquoten erzielt. So konnten diesmal alle der insgesamt 102 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae* Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1215411 problemlos und zuverlässig nachweisen. Mit Ausnahme von einem Teilnehmer, der sein Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert hat, wurden von teilnehmenden Laboratorien auch für die etwas schwächer positive Probe # 1215413 (ca. 10^4 Genomkopien/mL) durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet. Bei der Probe # 1215412 mit *Ureaplasma urealyticum* wurden von 98 Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse mit ihren jeweiligen *M. pneumoniae*-spezifischen Testsystemen beobachtet.

Bei den 3 falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung oder um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Aus diesem Grund sollten Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei der Probe mit *Ureaplasma urealyticum* versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Die "negative" Probe # 1215414, die anstelle der Zielorganismen diesmal lediglich *E. coli* enthielt, wurde von allen Teilnehmern als negativ befundet. 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.

Die diagnostische Performance eines etablierten *in-house* Protokolls und ausgewählter kommerzieller NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae* DNA wurde im Sollwertlabor für RV 541 (Prof. Jacobs und Dr. Dumke, Dresden) im Rahmen einer systematischen Studie untersucht. Auch hier erwiesen sich diese Testsysteme als spezifisch, sensitiv und auch zuverlässig bezüglich der Erfassung aller relevanten *M. pneumoniae* Subtypen und Varianten: Dumke, R. und E. Jacobs (2009) Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 47: 441-444.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 14 Teilnehmern die Verwendung des LightMix *M. pneumoniae*, Qiagen *M. pneumoniae* oder Minerva Venor Mp Testsystems angegeben (Code [20], [21] und [22] auf dem Ergebnisformular) und sie konnten damit eine Richtigkeitsquote von 100 %, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (5x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* Real Time PCR (5x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (4x), AmpliGnost *C. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik, Karlsruhe (4x), EasyMag von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik, Karlsruhe (1x), BD Probe Tec *M. pneumoniae* (1x), Nanogen/Medac Q-PCR Alert Kit (1x), Seegene Seeplex PneumoBacter ACE Detection (1x), Minerva Onar Mp (1x), Argene Chlamylege (1x), Muta Real *M. pneumoniae* der Fa. Immundiagnostik (1x) und Bacto real *M. pneumoniae* RT PCR Assay der Fa. Ingenetix (1x).

RV 542: *Coxiella burnetti*

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal zwei positive Proben: Probe # 1215422 mit einer relativ hohen Menge an Zielorganismen (*Coxiella burnetii*, $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL), und Probe # 1215424 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge (*C. burnetii*, $\sim 1 \times 10^4$ Genomkopien/mL); sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1215421 und # 1215423), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Die relativ stark positive Probe # 1215422 mit ca. 10^5 Genomkopien/mL wurde diesmal von allen der insgesamt 18 Teilnehmer als positiv befundet. Auch die Probe # 1215424 des aktuellen Probesets mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an *C. burnetii* DNA wurde ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert. Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus dem vorherigen Ringversuch - damals traten Schwierigkeiten beim zuverlässigen Nachweis von *C. burnetii* DNA erst bei Proben mit ca. 10^3 Genomkopien pro mL auf.

Bei dem falsch-positiven Ergebnis eines Teilnehmers bei Probe # 1215421 handelt es sich vermutlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung.

Sechzehn der insgesamt 18 Teilnehmer gaben die Verwendung eines eigenentwickelten (*in-house*) PCR assays an; bei zwei dieser Teilnehmer war explizit das "Transposase Gen (IS1111)" als Zielsequenz vermerkt. Zwei der 18 Teilnehmer verwendeten den vorkonfektionierten LightMix *C. burnetti* Kit der Fa. TIB Molbiol (Berlin) und beobachteten hiermit durchgehend korrekte Ergebnisse.

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

RV 543: *Francisella tularensis*

Dieser ebenfalls seit kurzem neu ins Programm 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 klinischen Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Nachdem sich in der letzten Ringversuchsrunde zum "orientierenden Herantasten" an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten NAT-gestützten Testsysteme einige schwach positive Proben befanden, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei eindeutig positive Proben: Probe # 1215431 mit einer sehr hohen Menge an *Francisella tularensis holarctica* ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) und Probe # 1215433 mit einer etwa hundertfach geringeren Menge (*F. tularensis holarctica*, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1215432 und # 1215434), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielten.

Ähnlich wie bei dem zuvor diskutierten Coxiellen-Ringversuch haben auch hier alle der 10 Teilnehmer die relativ stark positive Probe # 1215431 sowie die etwas schwächer positive Probe # 1215433 mit ihren NAT-gestützten Testsystemen korrekt identifiziert. Gleichfalls wurden die beiden *F. tularensis*-negativen Proben # 1215432 und # 1215434 von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet. Dies spricht zumindest für ein gutes Funktionieren der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

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

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

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.

July , 2012

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 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 scheme 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:

MAY 2012

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 # 1215301 and sample # 1215303), two samples with almost identical amounts of *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^3$ CFU/mL; sample # 1215302 and sample # 1215303), and one sample without *C. trachomatis* or gonococci target organisms (# 1215304).

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 145 participants, only 3 false-positive and 6 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 4 participants for sample # 1215303 which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of $\sim 10^3$ CFU/mL next to *C. trachomatis* organisms. For sample # 1215302, which contained an equal amount of *N. gonorrhoeae* target organisms but no *C. trachomatis*-infected cells, 27 false-negative results and 3 "questionable" were reported by 30 participants.

As the current distribution has not contained any challenging samples with *Neisseria* species other than *N. gonorrhoeae*, potential cross reactions of the assays can not be assessed this time.

For the ease of interpretation, we created some extra tables where only the CT-specific results (table 4) and the GO-specific results (table 5) sorted by the reported test system are depicted.

It seems that the sample composition of our current EQAS distribution is not revealing any systematic weaknesses of certain commercial or *in-house* NAT assay concepts designed for the combined detection of CT and GO with respect to analytical specificity or analytical sensitivity.

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 enrol in our comprehensive external quality assessment schemes for NAATs in diagnostic bacteriology.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained two samples with *C. trachomatis* target organisms (# 1215312 and # 1215313) with $\sim 1 \times 10^3$ IFU/mL and two samples without target organisms (# 1215311 and # 1215314) containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*.

As depicted in table 2 of statistical analysis, false-negative results for samples # 1215312 and # 1215313 (10^3 IFU/mL of *C. trachomatis*) were reported by only 3 and 4 of the 131 participants, respectively. For the "negative" samples # 1215311 and # 1215314, false-positive results were observed by only 4 and 2 of the 131 participants, respectively. No obvious or systematic correlation was observed between the event of reporting a false-negative or false-positive 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 131 participants of the current distribution.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1215322; 1×10^5 CFU/mL), one sample with an approximately hundredfold lower number of *Bordetella pertussis* (# 1215321; 1×10^3 CFU/mL), as well as two negative samples containing *Bordetella bronchiseptica*: sample # 1215323 with $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL, and sample # 1115324 with $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL. The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only 6 of the 120 participants reported false-negative results for the weak-positive *B. pertussis* sample # 1215321 (1×10^3 CFU/mL of target organisms) and one participant observed consecutively false-positive results for each of the remaining two "negative" samples containing significant amounts of *B. bronchiseptica* organisms. The latter false-positivity issue is probably due to PCR assay designed for the general detection of *Bordetella* spp., or contamination events in the course of sample preparation or completion of PCR reaction mixes. However, for participants who have observed false-negative results with sample # 1215321, it is strongly recommended to initiate appropriate measures to improve the analytical sensitivity of their assay concepts.

All of the remaining results reported by the 120 participants were correct. Run controls were performed by 118 participants and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained three samples with a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* strain, isolated from a patient in the course of a antibiotic therapy failure study in a kind of dilution series. Sample # 1215332 contained approximately 1×10^5 CFU/mL, sample # 1215334 approximately 1×10^4 CFU/mL and sample # 1215333 approximately 1×10^3 CFU/mL of the respective target organisms.

All of the 43 participants reported positive results for sample # 1215332 ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL) and sample # 1215334 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) tested positive in the specific PCR assays of 41 from the 43 participants. The weak positive sample, which contained only about 1×10^3 CFU/mL of *Helicobacter pylori* organisms, was still tested positive by 39 of 43 participants. One false-positive result was observed among the 43 participants for sample # 1215331, which contained only a significant number of *E. coli* cells within our proprietary sample matrix. The results of the current distribution again indicate a satisfactorily high level of assay specificity and sensitivity in the majority of the participating laboratories. As mentioned in the Report form, participants who are performing molecular tests for Clarithromycin resistance may indicate the corresponding results by accessory code numbers 71 or 72. Molecular resistance testing results were reported by 30 participants, and all have classified the strain correctly as Clarithromycin-resistant.

RV 534: EHEC / STEC

The current set of QC samples contained two samples positive for EHEC: # 1215341 (*E. coli*, 1×10^5 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-negative, *stx*₂-positive, *eae*-negative and *hly*A-negative) and # 1215343 (*E. coli*, 1×10^4 CFU/mL, clinical isolate, *stx*₁-negative, *stx*₂-positive, *eae*-negative and *hly*A-negative). The other two EHEC-negative samples contained an *eae*-positive EPEC strain (sample # 1215342; 1×10^4 CFU/mL) and an *eae*- and *hly*A-negative *E. coli* K12 strain (# 1215344).

By the way, the two positive samples (# 1215341 and # 1215343) contained the *stx*-2 positive *E. coli* isolate of the well-documented German EHEC outbreak in May 2011. We are very grateful to our colleague Dr. Matthias Pulz (President of the Governmental Institute of Public Health of Lower Saxony, Hannover, Germany) for providing one of the initial clinical isolates for quality control purposes.

Overall, there was a pretty good diagnostic performance of the EHEC-specific assays used by the 106 participants. Only a few false-positive results were observed for EHEC-negative samples #

1215342 and # 1215344 (presumably sporadic contamination issues) and a few false-negative results for EHEC samples # 1215341 and # 1215343. The sample # 1215342, containing significant amounts of a clinical EPEC isolate (only *eae*-positive), was reported correctly "EHEC negative" by 103 of the 106 participants.

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 103 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 strictu 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 spielmanii* (# 1215351; $\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL), one sample with *Borrelia garinii* (sample # 1215352; $\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL), and one sample with *Treponema phagedenis* (# 1215353). Sample # 1215354 contained no *Borrelia* organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Relatively high amounts of *Borrelia* ($\sim 1 \times 10^5$ organisms/mL) were present in samples # 1215351 and # 1215352, which consequently tested positive by all but one of the reporting 110 participating laboratories.

Sample # 1215353 of the current set contained non-infected human cells and *Treponema phagedenis* organisms. Only two participant reported "questionable" results and two participants reported a false-positive result for this negative sample (presumably due to some intralaboratory cross-contamination events or limitations in analytical specificity of the corresponding PCR protocol).

Sample # 1215354 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. Since only 4 false-positive results were observed for the truly "negative" sample, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. The 4 participants who reported false-positive results should check their analytical workflow and/or NAT assay concepts for the possibility of contaminating 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* (5x), EliGene *Borrelia* LC 2 from Elisabeth Pharmacon (3x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (4x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (2x), Analytik Jena RapidSTRIP *Borrelia* assay (2x), Zecken Screening Kit from Autoimmun Diagnostika (2x), Immundiagnostik MutaGEL *Borrelia* (1x) and Ingenetix *Borrelia burgdorferi sensu lato sp.* Assay (1x).

RV 536: *Legionella pneumophila*

In order to assess the analytical sensitivity of certain *Legionella pneumophila*-specific PCR assays, the current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Legionella pneumophila* serogroup 3: sample # 1215361 (1×10^5 CFU/mL), sample # 1215364 (1×10^4 CFU/mL) and sample # 1215363 (1×10^3 CFU/mL). Sample # 1215362 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. With the exception of 3 false-negative results for sample # 1215361, this *L. pneumophila*-positive sample was tested positive by 87 of the 90 participating laboratories. As expected, a slightly higher number of "false-negative" results were observed with samples # 1215364 (1×10^4 CFU/mL) and # 1215363 (1×10^3 CFU/mL), which contained approximately tenfold and hundredfold less amounts of *L. pneumophila* organisms. Here, false negative results were observed by 4 and 24 participants, respectively. As it seems that the lower limit of detection

of currently established PCR assays has been touched somehow with the weak positive sample containing 1×10^3 CFU/mL of target organisms, we have not scored a (false) negative result for sample # 1215363 in the course of issuing the corresponding QC certificates.

Since only one false-positive result was observed for the "negative" sample # 1215362, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 537: *Salmonella enterica*

The current set of QC samples contained one sample with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (sample # 1215373 with 5×10^5 CFU/mL) and one sample with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (sample # 1215371 with 5×10^4 CFU/mL). Sample # 1215374 contained this time a *Campylobacter jejunii* strain and sample # 1215372 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. The discussion of the PCR results reported by the 7 participants of the current distribution is very concise: no false-positive results and only one false-negative result was reported for the QC samples, no cross-reactions with the *E. coli* strain were observed, and the percentage of true positive results as well as for true-negative results was nearly 100 %. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays.

RV 538: *Listeria* spp.

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1215383; only *E. coli* cells), and three samples positive for *L. monocytogenes*. In order to assess the analytical sensitivity of the NAT assays currently used at the participating laboratories, we decided to include also some weak positive samples in the current distribution. Relatively low numbers of *L. monocytogenes* cells ($\sim 5 \times 10^4$ CFU/mL and $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) were present in samples # 1215381 and # 1215384, respectively, and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays applied by all of the 26 participants. Although the third "positive" sample contained a remarkably low amount of target organisms (# 1215382; $\sim 5 \times 10^2$ CFU/mL of *L. monocytogenes*), it was nice to see that all but one of the 26 participating laboratories were still able to detect the corresponding DNA by their *Listeria*-specific PCR assays.

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

RV 539: MRSA

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

To make life a little bit easier (after several rounds of demanding MRSA PCR proficiency testing containing some "difficult" samples with mixed species or exotic SCC_{mec} cassette types), the

current set contained one samples with significant amounts of a typical community acquired (CA)-MRSA isolate and a sample containing significant amounts of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci next to a negative sample.

Sample # 1215391 of the current set contained significant numbers of **cMRSA** organisms (clinical isolate of cMRSA, methicillin-resistant, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Although this was not a real challenge regarding the analytical sensitivity of the PCR assays used, it is really nice to see that this MRSA positive sample was tested positive by all of the 228 participants.

Sample # 1215393 contained a methicillin-susceptible but PVL-positive *S. aureus* isolate (cMSSA, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL). Next to 224 (correct) negative results, one "questionable" result and 3 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 # 1215394 of the current set (which contained only *E. coli* and human cells) and sample # # 1215392 (which contained a clinical isolate of a methicillin-susceptible CoNS strain, *mecA*-positive, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), were tested correctly negative by 227 and 222 of the 228 participants, respectively. The surprisingly low number of false-positive results seen with the latter two samples indicates the broad application of sophisticated diagnostic workflows without significant contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

Except the minor issue with 3 false-positive MRSA results in the cMSSA sample # 1125393, and 4 false-positives with the methicillin-resistant (*mecA*-positive) CoNS strain, 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 64 of the 228 participating laboratories - all laboratories correctly classified the cMRSA strain in sample #1215391 as PVL-positive.

For further information about the underlying clinical case of the cMSSA isolate see: Wenzel JJ, Hentschel J, Silvis W, Permanetter W, Mattes J, Kochanowski B, Herterich R, Jilg W, Linde HJ (2009) Rapidly fatal necrotizing pneumonia in a 12-year-old boy caused by co-infection with parainfluenza virus type 1 and Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Infection* **37**:75-77.

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).

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1215403 was spiked with $\sim 1 \times 10^6$ IFU/ml of *C. pneumoniae* whereas sample # 1215401 contained

an approximately hundredfold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ IFU/ml). Sample # 1215402 contained significant numbers of *Chlamydia trachomatis* A organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1215404. As depicted in table 2, no false-negative results were observed for the strong positive sample # 1215403 (10^6 IFU/mL) and only 3 false-negative results were observed for the hundredfold weaker positive sample # 1215401 (10^4 IFU/ml). Since only two false-positive results were observed for the "negative" sample # 1215404, it seems that the majority of participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. Three participants reported false-positive results for sample # 1215402 (*Chlamydia trachomatis*) which could be due to certain shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR / NAT assays. 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 two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL) was present in sample # 1215411 and an approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ($\sim 1 \times 10^4$ genome copies/mL) was present in sample # 1215413. Sample # 1215412 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *Ureaplasma urealyticum* ($\sim 1 \times 10^2$ CFU/mL), a species of a genus related to Mycoplasma. The set was completed by sample # 1215414, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

As also observed during the past distributions of our EQAS scheme for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or *in-house* PCR/NAT-assays has led to a surprisingly high percentage of correct results. Among the *M. pneumoniae*-specific results reported by the 102 participants, all laboratories reported correct positive results for the positive samples # 1215411 and # 1215413. One participant classified his result as "questionable" for the latter sample. Sample # 1215412, which was spiked with about 10^2 CFU/mL of *Ureaplasma urealyticum*, was tested correctly negative 98 of the 102 participants. Three participants reported false-positive results for the *Ureaplasma* sample, which could be due to certain shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR / NAT assays.

Sample # 1215414 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. Otherwise there were no inhibition events or other noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

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 two positive samples: sample # 1215422 contained about 1×10^5 genome copies/mL, and sample # 1215424 about 1×10^4 genome copies/ml. A relatively high amount of *C. burnetii* organisms was present in sample # 1215422, which consequently were tested positive by all of the 18 participating laboratories. Sample # 1215424, which contained an approximately ten-fold lower number of *C. burnetii* genome copies per ml, was also identified as "positive" by all of the 18 participants. 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 # 1215421 and # 1215423 of the current set contained no target organisms but non-infected human cells and *E. coli* cells. One participant determined a false-positive result for the negative sample # 1215421, which could be due to certain shortcomings in analytical specificity of the respective PCR assay or just a "simple" cross-contamination event in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps.

Since no further false-positive results were observed for the two "negative" samples, it seems that the majority of 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 two positive samples: a relatively high amount of *Francisella tularensis holarctica* ($\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL) was present in sample # 1215431, and an approximately hundred-fold lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) was present in sample # 1215433.

The discussion of the PCR results reported by the 10 participants of the current distribution is very concise: no false-positive or false-negative results were reported for the QC samples, no cross-reactions with the *E. coli* strain were observed, and the percentage of true positive results as well as for true-negative results was 100 %. Since no further false-positive results were observed for the two "negative" samples, it seems that the majority of participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Francisella tularensis*-specific PCR assays and the implementation of a well-structured workflow among the participating laboratories. So 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) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215301	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1215302	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1215303	+ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1215304	∅ / ∅	64	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 145</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1215301	1215302	1215303	1215304	1215301	1215302	1215303	1215304	
Befund Result									
Positiv CT	141	0	4	2	n.d.	0	0	0	0
Positiv CT & GO	0	1	138	0	nein / no	145	145	145	145
Positiv GO	0	114	3	0	ja / yes	0	0	0	0
Negativ	3	27	0	143					
Fraglich / questionable	1	3	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>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 7)	15	15 / 20 §	75	7	7 / 7	100
LightMix CT/NG [21] (n = 9)	23	23 / 27	85	9	9 / 9	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 22)	60	60 / 66	91	22	22 / 22	100
COBAS Amplicor [23] (n = 10)	30	30 / 30	100	10	10 / 10	100
BD ProbeTec [24] (n = 17)	41	41 / 50 §	82	16	16 / 17	94
Artus CT [25] (n = 3)	7	7 / 9	78	3	3 / 3	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 31)	92	92 / 93	99	31	31 / 31	100
Other commercial tests [27] (n = 40)	111	111/119 §	93	40	40 / 40	100

In house PCR assay [28] (n = 18)	47	47 / 53 [§]	89	17	17 / 18	94
Andere / k.A. / other [29] (n = 10)	29	29 / 30	97	8	8 / 10	80

Legend for Table 3:

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

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

Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden. Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für *Chlamydia trachomatis* dargestellt.

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

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

NAT-Methode (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)	13	13 / 14	93	13	13 / 13 [§]	100
LightMix CT/NG [21] (n = 9)	17	17 / 18	94	18	18 / 18	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 22)	44	44 / 44	100	44	44 / 44	100
COBAS AmpliCor [23] (n = 10)	20	20 / 20	100	20	20 / 20	100
BD ProbeTec [24] (n = 17)	32	32 / 34	94	33	33 / 34	97
Artus CT [25] (n = 3)	5	5 / 6	83	6	6 / 6	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 31)	62	62 / 62	100	62	62 / 62	100
Other commercial tests [27] (n = 40)	79	79 / 80	99	80	80 / 80	100
In house PCR assay [28] (n = 18)	34	34 / 35 [§]	97	35	35 / 36	97
Andere / k.A. / other [29] (n = 10)	20	20 / 20	100	18	18 / 20	90

* 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 bei Anwendern verschiedener Methoden. Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für Neisseria gonorrhoeae dargestellt.

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

NAT-Methode (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)	10	10 / 14	71	14	14 / 14	100
LightMix CT/NG [21] (n = 9)	15	15 / 18	83	18	18 / 18	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 22)	38	38 / 44	86	44	44 / 44	100
COBAS Amplicor [23] (n = 10)	20	20 / 20	100	20	20 / 20	100
BD ProbeTec [24] (n = 17)	27	27 / 33 §	82	34	34 / 34	100
Artus CT [25] (n = 3)	5	5 / 6	83	6	6 / 6	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 31)	60	61 / 62	98	62	62 / 62	100
Other commercial tests [27] (n = 40)	72	72 / 79 §	91	80	80 / 80	100
In house PCR assay [28] (n = 18)	30	30 / 36	83	36	36 / 36	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 10)	19	19 / 20	95	20	20 / 20	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 *Chlamydia trachomatis*
(RV 531) Mai 2012



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215311	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215312	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1215313	+	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL)
1215314	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 131</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1215311	1215312	1215313	1215314		1215311	1215312	1215313	1215314
Befund <i>Result</i>									
Positiv	4	128 ¹⁾	127	2	n.d.	2	2	2	2
Negativ	126	3	4	129	nein <i>no</i>	128	129	129	129
Fraglich <i>Questionable</i>	1	0	0	0	ja <i>yes</i>	1	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>	%
GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 23)	46	46 / 46	100	45	45 / 46	98
LightMix CT [21] (n = 2)	3	3 / 4	75	4	4 / 4	100
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 36)	70	70 / 72	97	70	70 / 72	97
COBAS Amplicor [23] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100
BD ProbeTec [24] (n = 18)	35	35 / 36	97	36	36 / 36	100
Artus CT [25] (n = 7)	14	14 / 14	100	14	14 / 14	100
Abbott CT/NG [26] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100
Other commercial tests [27] (n = 19)	36	36 / 38	95	36	36 / 37 [§]	97
In house PCR assay [28] (n = 17)	33	33 / 34	97	32	32 / 34	94
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	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.

**PCR-/NAT *Bordetella pertussis*
 (RV 532) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215321	+	61	<i>Bordetella pertussis</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1215322	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1215323	Ø	62	<i>Bordetella bronchiseptica</i>
1215324	Ø	62	<i>Bordetella bronchiseptica</i>

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

<i>n = 120</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1215321	1215322	1215323	1215324	1215321	1215322	1215323	1215324	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	113	120	1	1	n.d.	2	2	2	2
Negativ	6	0	119	119	nein <i>no</i>	118	118	118	118
Fraglich <i>Questionable</i>	1	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 = 52)	101	101/103 §	98	104	104 / 104	100
In house PCR assay [28] (n = 65)	126	126 / 130	97	128	128 / 130	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	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 *Helicobacter pylori*
 (RV 533) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215331	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215332	++	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA mut. in 28S rDNA)
1215333	(+)	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA mut. in 28S rDNA)
1215334	+	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA mut. in 28S rDNA)

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

<i>n = 43</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1215331	1215332	1215333	1215334	1215331	1215332	1215333	1215334	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	1	43 ¹⁾	39 ¹⁾	41 ¹⁾	n.d.	0	0	0	0
Negativ	42	0	4	2	nein <i>no</i>	43	43	43	43
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 [26] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100
Commercial assay [27] (n = 17)	48	48 / 48	100	16	16 / 17	94
In house PCR assay [28] (n = 26)	72	72 / 78	92	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.

Comments: ¹⁾ Thirty of the 43 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. All reported results were correct.

**PCR-/NAT EHEC / STEC
 (RV 534) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215341	+++	61 / 72	EHEC (~1x10 ⁵ CFU/mL) (<i>stx-2</i> positive)
1215342	∅	62	EPEC (~1x10 ⁴ CFU/mL) (<i>eae</i> positive)
1215343	++	61 / 72	EHEC (~1x10 ⁴ CFU/mL) (<i>stx-2</i> positive)
1215344	∅	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 = 106</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1215341	1215342	1215343	1215344	1215341	1215342	1215343	1215344	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	105 ¹⁾	2	104 ¹⁾	1	n.d.	1	1	1	1
Negativ	1	103	2	105	nein <i>no</i>	105	105	105	105
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>	%
GenoType EHEC (Hain) [20] (n = 28)	55	55 / 56	98	56	56 / 56	100
Hyplex EHEC [21] (n = 5)	10	10 / 10	100	10	10 / 10	100
Other commercial tests [27] (n = 17)	34	34 / 34	100	34	34 / 34	100
In house PCR assay [28] (n = 54)	106	106 / 108	98	104	104/107 §	97
Andere/ k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	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⁾ Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 103 laboratories.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 535) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215351	+++	61	<i>Borrelia spielmanii</i> (~ 1x10 ⁵ organisms/mL)
1215352	+++	61	<i>Borrelia garinii</i> (~1x10 ⁵ organisms/mL)
1215353	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i> und <i>E. coli</i> K12
1215354	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n</i> = 110	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1215351	1215352	1215353	1215354		1215351	1215352	1215353	1215354
Befund <i>Result</i>									
Positiv	109	110	2	4	n.d.	3	3	3	3
Negativ	1	0	106	106	nein <i>no</i>	107	107	107	107
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	2	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>	%
artus <i>Borrelia</i> LC Kit [20] (n = 23)	46	46 / 46	100	45	45 / 46	98
Demeditec GenFlow [21] (n = 9)	18	18 / 18	100	17	17 / 18	94
Other/commercial tests [27] (n = 20)	40	40 / 40	100	38	38 / 39 [§]	97
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 59)	117	117 / 118	99	114	114 / 117 [§]	97
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.

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

**PCR-/NAT *Legionella pneumophila*
 (RV 536) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215361	+++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1215362	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215363	+	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ³ CFU/mL)
1215364	++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)

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

<i>n = 90</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1215361	1215362	1215363	1215364		1215361	1215362	1215363	1215364
Befund <i>Result</i>									
Positiv	87	1	65	86	n.d.	1	1	1	1
Negativ	3	89	24 ¹⁾	4	nein <i>no</i>	89	89	89	89
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>	%
Other commercial tests [27] (n = 39)	102	102 / 117	87	39	39 / 39	100
In house PCR assay [28] (n = 49)	133	133 / 147	90	48	48 / 49	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 8 [§]	75	3	3 / 3	100

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

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

Comments: ¹⁾ As sample #1215363 contained a very low number of *Legionella pneumophila* target organisms, negative PCR results were not rated as "false negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*
 (RV 537) Mai 2012**



Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.

Sample composition and expected results.

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215371	++	61	<i>S. enterica</i> ser. Enteritidis (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
1215372	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215373	+++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 5x10 ⁵ CFU/mL)
1215374	∅	62	<i>Campylobacter jejunii</i>

Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.

Absolute numbers of reported individual results.

<i>n = 7</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1215371	1215372	1215373	1215374		1215371	1215372	1215373	1215374
Befund <i>Result</i>									
Positiv	6	0	7	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	1	7	0	7	nein <i>no</i>	7	7	7	7
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 = 1)	1	1 / 2	50	2	2 / 2	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 6)	12	12 / 12	100	12	12 / 12	100

**PCR-/NAT *Listeria spp.*
 (RV 538) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215381	+++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
1215382	+	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 5x10 ² CFU/mL)
1215383	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215384	++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL)

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

<i>n</i> = 26	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1215381	1215382	1215383	1215384		1215381	1215382	1215383	1215384
Befund <i>Result</i>									
Positiv	26	25	0	26	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	1	26	0	nein <i>no</i>	26	26	26	26
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>	%
Other commercial tests [27] (n = 3)	9	9 / 9	100	3	3 / 3	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 22)	66	66 / 66	100	22	22 / 22	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 3	67	1	1 / 1	100

PCR-/NAT MRSA / cMRSA (RV 539) Mai 2012



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215391	++	61 / 71,72	cMRSA (<i>S. aureus</i> , oxa ^R , PVL-pos) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1215392	∅	62 / 76	CoNS (oxa ^R) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1215393	∅	62 / 71,72	cMSSA (<i>S. aureus</i> , oxa ^S , PVL-pos) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1215394	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n</i> = 228	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1215391	1215392	1215393	1215394		1215391	1215392	1215393	1215394
Befund <i>Result</i>									
Positiv	228	4	3	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	222	224	227	nein <i>no</i>	228	227	228	228
Fraglich, <i>Questn.</i>	0	2	1	0	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=38)	38	38 / 38	100	114	114 / 114	100
GenoType MRSA Direct [21] (n=39)	39	39 / 39	100	115	115 / 117	98
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=4)	4	4 / 4	100	12	11 / 11 §	100
LightCycler Kits [23] (n=2)	2	2 / 2	100	6	6 / 6	100
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=62)	62	62 / 62	100	186	186 / 186	100
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=28)	28	28 / 28	100	84	84 / 84	100
LightMix <i>MRSA</i> (TIB Molbiol) [26] (n=2)	2	2 / 2	100	6	6 / 6	100
Commercial assay kit [27] (n=15)	15	15 / 15	100	44	44 / 45	98
<i>In house</i> PCR assay [28] (n=43)	43	43 / 43	100	123	123 / 127 §	97
Andere / k.A. / <i>other</i> [29] (n=11)	11	11 / 11	100	32	32 / 33	97

* 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 cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 64 laboratories. All reported results were correct.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*
 (RV 540) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215401	++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁴ IFU/mL)
1215402	∅	62	<i>Chlamydia trachomatis A</i> (~ 1x10 ⁵ IFU/mL)
1215403	+++	61	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 ⁶ IFU/mL)
1215404	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 97</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1215401	1215402	1215403	1215404		1215401	1215402	1215403	1215404
Befund <i>Result</i>									
Positiv	93	3	97	2	n.d.	1	1	1	1
Negativ	3	94	0	95	nein <i>no</i>	96	96	96	96
Fraglich <i>Questionable</i>	1	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>	%
LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n = 15)	29	29 / 30	97	29	29 / 30	97
Other commercial tests [27] (n = 33)	65	65 / 66	98	65	65 / 66	98
In house PCR assay [28] (n = 48)	95	95 / 96 §	99	93	93 / 96	97
Andere / k.A. / other [29] (n=1)	2	2 / 2	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) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215411	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁵ genome copies/mL)
1215412	∅	62	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (~ 1x10 ² CFU/mL)
1215413	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 ⁴ genome copies/mL)
1215414	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n</i> = 102	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
Befund <i>Result</i>	1215411	1215412	1215413	1215414	1215411	1215412	1215413	1215414	
Positiv	102	3	101	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	98	0	102	nein <i>no</i>	102	102	102	102
Fraglich <i>Questionable</i>	0	1	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>M.pneumoniae</i> [20] (n = 10)	20	20 / 20	100	20	20 / 20	100
Qiagen <i>M.pneumoniae</i> [21] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	4 / 6	100
Minerva Venor Mp [22] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Commercial assay / kit [27] (n = 34)	68	68 / 68	100	67	67 / 67 §	100
In house PCR assay [28] (n = 51)	101	101/101 §	100	100	100 / 102	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 3)	6	6 / 6	100	5	5 / 6	83

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

**PCR-/NAT *Coxiella burnetii*
 (RV 542) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215421	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215422	+++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 ⁵ genome copies/mL)
1215423	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215424	++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 ⁴ genome copies/mL)

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

<i>n</i> = 18	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
Befund <i>Result</i>	1215421	1215422	1215423	1215424	1215421	1215422	1215423	1215424	
Positiv	1	18	0	18	n.d.	0	0	0	0
Negativ	17	0	18	0	nein <i>no</i>	18	18	18	18
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>	%
<i>LightMix C. burnetii</i> [20] (n = 2)	4	4 / 4	100	4	4 / 4	100
<i>In house PCR assay</i> [28] (n = 16)	32	32 / 32	100	31	31 / 32	97

**PCR-/NAT *Francisella tularensis*
 (RV 543) Mai 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1215431	+++	61	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
1215432	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1215433	++	61	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
1215434	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n</i> = 10	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
Befund <i>Result</i>	1215431	1215432	1215433	1215434	1215431	1215432	1215433	1215434	
Positiv	10	0	10	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	0	10	0	10	nein <i>no</i>	10	10	10	10
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>F.tularensis</i> [20] (n = 4)	8	8 / 8	100	8	8 / 8	100
Commercial assay / kit [27] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
In house PCR assay [28] (n = 8)	16	16 / 16	100	16	16 / 16	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.