



Regensburg, den 16. Dezember 2010

An die Teilnehmer

der INSTAND e.V. -Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT

(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 21-28 of this document. As always, result tables are depicted in a bilingual style.

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

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

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

Falls Sie an einer etwas umfangreicheren Diskussion unserer Ringversuchsaktivitäten im Bereich "Bakteriengenom-Nachweis" und näheren Informationen zur Konzeption der Ringversuchsproben interessiert sein sollten, sei hier wie gehabt auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: BÄMI, Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.) verwiesen:

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2003) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologe* **13**:149-156.

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2004) *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Sowohl im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms als auch bei 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. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD 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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurden in zwei der 4 Einzelproben des **RV 530** bestimmte ***Neisseria*-Spezies** ausgesandt, die bekanntermaßen mit einigen Gonokokken-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagieren können und zum anderen befand sich ein *S. aureus* Stamm (sog. ***mecA dropout Mutante***) in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs **RV 539**.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis war für den aktuellen Ringversuch eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Leider war nach der erfolgreichen Konfektionierung und Herstellung von zwei Proberingversuchen für den NAT-gestützten Nachweis von ***Coxiella burnetti*** und ***Francisella tularensis*** die Frist bis zur Aussendung des November-Ringversuchs zu kurz. Diese beiden neuen erregerspezifischen Ringversuche sind bereits als **RV 542** und **RV 543** in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen und werden im Rahmen der kommenden Aussendung (April 2011) für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart.

NOVEMBER 2010:

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 # 1025302, 1025304, sowie die positive Probe des RV 531 # 1025313), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1025302), EHEC (Probe # 1025344), *Borrelia bavariensis* (Probe # 1025351), *Legionella pneumophila* (Probe # 1025363), *Salmonella enterica* (Probe # 1025373), *Listeria monocytogenes* (Probe # 1025383), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1025404). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen an potentiell mit Gonokokken-spezifischen NAT-Testsystemen kreuzreagierenden *Neisseria*-Spezies in den Proben # 1025301 (*N. sicca*) und # 1025303 (*N. lactamica*) sowie einem *S. aureus* Stamm in Probe # 1025392, der eine SCCmec Kasette mit nicht funktionellem *mecA* Gen aufweist (sog. *mecA dropout Mutante*) und vermutlich in einigen der SCCmec-gestützten NAT-Testsystemen zu falsch-positiven Ergebnissen für MRSA führen dürfte. 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.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis* und Gonokokken-Nachweis. Trotz der relativ geringen Erregermenge in zwei der vier positiven Proben und der Aussendung von zwei *Neisseria*-Spezies, die bekanntermaßen mit einigen Gonokokken-spezifischen Testsystemen kreuzreagieren können, führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für beide Zielorganismen zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit gleichen (relativ geringen) Mengen an *C. trachomatis* ($\sim 10^3$ IFU/mL in den Proben # 1025302 und # 1025304); zwei Proben mit einer hohen und einer etwa 10-fach geringeren Menge an *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^4$ CFU/mL in Probe # 1025304 und $\sim 10^3$ CFU/mL in Probe # 1025302) sowie zwei Proben mit nennenswerten Mengen an *Neisseria sicca* (# 1025301) und *Neisseria lactamica* (# 1025303).

Trotz der relativ geringen Mengen an *C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae* Zielorganismen in den beiden positiven Proben des aktuellen Ringversuchs fanden sich unter den von insgesamt 128 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* nur ein falsch-positives Ergebnis

und 9 falsch-negative Ergebnisse, die vermutlich in einer unzureichenden analytischen Sensitivität der eingesetzten Testsysteme begründet sind. Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden nur von 8 Teilnehmern falsch-negative Ergebnisse für die Probe # 1025302 (*N. gonorrhoeae* in relativ geringer Menge von ca. 10^3 CFU/mL) mitgeteilt.

Fünf weitere Teilnehmer berichteten ein falsch-negatives Ergebnis für die Probe # 1025304, die diesmal eine etwa 10-fach höhere Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen enthielt. Auch hier sind die Ursachen für solche falsch-negativen Ergebnisse wohl am ehesten in einer unzureichenden analytischen Sensitivität der eingesetzten Testsysteme begründet. Insbesondere bei der Probe # 1025304 (mit ca. 10^3 CFU/mL an *N. gonorrhoeae*) sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Im Gegensatz zu einigen früheren Ringversuchen kann bei den beiden CT- und GO-positiven Proben diesmal auch nicht argumentiert werden, daß ein negatives Ergebnis für *N. gonorrhoeae* durch die gleichzeitige Anwesenheit von *C. trachomatis* Nukleinsäure bei einigen kombinierten Testsystemen verursacht wurde. Die relativ geringen Mengen an Zielorganismen im aktuellen Probenstet sowie die restlichen (für NAT-Verfahren eher unproblematischen) Bestandteile unserer Probenmatrix sollten aus amplifikationstechnischer Sicht nicht mit der erreichbaren analytischen Sensitivität für *C. trachomatis* und/oder *N. gonorrhoeae* interferieren. Das Argument einer möglichen gegenseitigen Beeinflussung der NAT-Testkomponenten wird zusätzlich durch die Beobachtung entkräftet, daß die Zielorganismen in diesen Proben nahezu von allen Teilnehmern mit den jeweils eingesetzten Testsystemen im Großen und Ganzen zufriedenstellend detektiert und befundet werden konnten.

Interessanterweise konnte die eigentlich etwas höher erwartete Rate an falsch-positiven Ergebnissen für *N. gonorrhoeae* bei den Proben # 1025301 (*Neisseria sicca*) und # 1025303 (*Neisseria lactamica*) nicht beobachtet werden. Falsch-positive Ergebnisse für *Neisseria lactamica* (Probe # 1025303) wurden hier nur spärlich und nicht systematisch von 2 der 19 Teilnehmer mit dem BD ProbeTec Test, von einem der 20 Teilnehmer mit der (eigentlich nicht mehr aktuellen Version) des Roche COBAS Amplicor Tests und von 7 der insgesamt 45 Teilnehmer beobachtet, die die Verwendung von "anderen kommerziellen Tests" oder eines selbstentwickelten PCR assays angegeben haben. Nur von einem Teilnehmer, der die Verwendung eines nicht näher spezifizierten "in-house" Protokolls angegeben hat, wurde ein für den Zielorganismus *N. gonorrhoeae* falsch-positives Ergebnis bei der Probe # 1025301 (*Neisseria sicca*) beobachtet.

Neben der durchwegs guten analytischen Sensitivität spricht dies auch für eine inzwischen sehr hohe analytische Spezifität der gegenwärtig eingesetzten kommerziellen und eigenentwickelten NAT-Testsysteme. Bekanntermaßen wiesen ja in der Vergangenheit einige der gebräuchlichen Testsysteme bestimmte Defizite hinsichtlich ihrer Spezifität für den Gonokokken-Nachweis auf !

Im Zusammenhang mit den augenscheinlich etwas geringeren Richtigkeitsquoten bestimmter kommerzieller Testsysteme bei schwach positiven Proben soll noch einmal darauf hingewiesen werden, daß die maximal erreichbare analytische Sensitivität auch zu einem gewissen Teil durch die entsprechend vorgegebenen Prozeduren zur Probenaufarbeitung und -prozessierung bedingt wird. So wird das eingesetzte klinische Probenmaterial beispielsweise im Rahmen der vorschriftsmäßigen Abarbeitung des CT/GO-spezifischen BD ProbeTec Testsystems relativ stark verdünnt. Dies geschieht möglicherweise auch präventiv zur Verringerung der Konzentration von bestimmten Substanzen in Urinproben oder anderem geeigneten Untersuchungsmaterial, die das proprietäre isotherme Amplifikationsverfahren dieses Testsystems inhibieren könnten. Da unsere standardisierten Ringversuchsproben jedoch auf Probeneinsatzvolumina von 100 bis 200 µl ausgelegt sind, auf allen uns zur Verfügung stehenden Testplattformen erfolgreich vorgetestet sind, und auch keine nennenswerten Mengen an inhibitorischen Substanzen enthalten, könnten Verdünnungen in Extraktions- oder Lysepuffern hier zu unnötigen Einbußen in der Sensitivität führen. Diese Effekte sollten gegebenenfalls herstellerseitig abgeklärt und mit den betroffenen Kunden diskutiert werden. Angesichts der streng normierten und standardisierten Abarbeitungsprotokolle von kommerziellen Testsystemen bleibt es für den Ringversuchsleiter

jedesmal aufs Neue verwunderlich, daß ein nennenswerter Anteil der teilnehmenden Laboratorien mit den betroffenen Testsystemen erfolgreich die vorgegebenen Zielwerte erreicht.

Demgegenüber sollte aber die Ergebnislage bei den Testsystemen der Fa. Gen-Probe differenziert betrachtet werden. Wie an dieser Stelle bereits mehrmals ausgeführt, handelt es sich hierbei um NAT-Testsysteme, die bekanntermaßen erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen und in der Praxis an nativem Probenmaterial gute Leistungsdaten aufweisen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann unter Einsatz der vorgeschriebenen Mengen des hier versandten Probenmaterials offensichtlich keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Daher sind diese Testsysteme und die entsprechenden Richtigkeitsquoten in den Tabellen der statistischen Auswertung grau dargestellt. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Dies deutet, zumindest indirekt, auf ausreichend hohe Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin. Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 128 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nur von einem Teilnehmer bei einer der 4 Einzelproben auf dem Ergebnisbogen 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 diesen kombinierten Testsystemen wurden insgesamt relativ hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detailliertere Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden diesmal zusätzlich die Tabellen 4, 5 und 6 angefertigt. In Tabelle 4 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in Tabelle 5 nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet. Tabelle 6 dient zur selektiven Darstellung der falsch-negativen und falsch-positiven Ergebnisse nach mitgeteilter NAT-Methode oder kommerziellem Testsystem bei den Proben # 1025301 (*Neisseria sicca*) und # 1025303 (*Neisseria lactamica*). **Anmerkung:** Bevor durch einen kurzen Blick auf die prozentualen Richtigkeitsquoten in diesen Tabellen ein eventuell etwas zu voreiliger Rückschluß auf die diagnostischen Qualitäten bestimmter kommerzieller Testsysteme gezogen wird, sollten erst die effektiven Teilnehmerzahlen berücksichtigt werden, die arithmetisch zu den dargestellten Richtigkeitsquoten geführt haben.

Im Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurde übrigens unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Amplex Hyplex STD (7x), Cobas 4800 System (3x), TibMolbiol LightMix NG (3x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (2x), Sacace Biotechnologies *N. gonorrhoeae* Real-TM (1x), Sacace Biotechnologies *C. trachomatis* Real-TM (1x), TIGRIS DTS System (1x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), und Euroclone Duplica Real Time *N. gonorrhoeae* Detection Kit (1x).

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal nur eine Probe mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1025313 mit 10^3 IFU/mL an *C. trachomatis*), sowie drei Proben ohne

Zielorganismen (# 1025311, # 1025312 und # 1025314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei der positiven Probe # 1025313 lediglich von je 2 der insgesamt 115 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bis auf 3 falsch-positive Ergebnisse wurden diesmal bei den negativen Proben # 1025311, # 1025312 und # 1025314 durchwegs richtig negative Ergebnisse berichtet und unter den insgesamt 440 mitgeteilten Ergebnissen wurde auch kein Ergebnis als "fraglich" oder von den Teilnehmern im Ergebnisbogen als "inhibiert" klassifiziert.

Im Rahmen des Ringversuchs November 2008 wurde ein Probenstet mit nahezu identischer Konstellation und Menge an Zielorganismen versandt. Interessanterweise wurden damals auch nahezu identische Befundkonstellationen beobachtet: bei den Proben # 82101 und # 82102 wurden lediglich von je 2 der insgesamt 106 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bei Probe # 82104 wurden 4 falsch-negative Befunde erhalten. Die negative Probe # 82103 wurde damals von 103 der insgesamt 106 Teilnehmer als richtig negativ befundet. Diese markante Übereinstimmung der beiden Ergebniskonstellationen kann, zumindest indirekt, als Beleg für eine hohe Zuverlässigkeit und Konstanz der eingesetzten Testsysteme und der Probenabarbeitung aufgeführt 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 nicht beobachtet. In diesem Zusammenhang sei kurz angemerkt, daß wir auch diesmal keine der Ringversuchsproben absichtlich mit inhibitorischen Substanzen versetzt haben. Erfreulicherweise waren im Rahmen dieses Ringversuchs im Großen und Ganzen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und den selbstentwickelten *in house*-Testsystemen zu beobachten. Trotz der relativ geringen Menge an Zielorganismen bewegten sich die Richtigkeitsquoten dabei durchwegs auf hohem Niveau mit geringer statistischer Streuung.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: Hain GenoQuick CT (4x), Minerva Biolabs Onar CT qPCR Kit (2x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (1x), BD Viper System with XTR (1x), TIGRIS DTS System (1x), artus CT Plus PCR Kit (1x), und Roche COBAS Amplicor (1x).

RV 532: *Bordetella pertussis*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt eine Probe mit relativ hoher Menge an *Bordetella pertussis* (# 1025322, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit ähnlich hoher Menge an *Bordetella parapertussis* (# 1025324, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL), eine Probe mit etwas geringer Menge an *Bordetella bronchiseptica* (# 1025321, $\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1025323), die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial als Probenmatrix enthielt.

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*-positive Probe # 1025322 sowie die negative Probe ohne *Bordetella* spp. (# 1025323) wurden von nahezu allen der insgesamt 103 Teilnehmer korrekt befundet.

Falsch-positive Ergebnisse wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs lediglich von 4 Teilnehmern für die negative Probe # 1025321 (*B. bronchiseptica*, 10^4 CFU/mL) und von 10 Teilnehmern für die negative Probe # 1025324 (*B. parapertussis*, 10^4 CFU/mL) mitgeteilt. Hierbei handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination

während der Probenextraktion und -arbeitung 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 (immer daran denken: *der nächste Ringversuch kommt bestimmt :-)*).

Inhibitionskontrollen wurden von 101 der insgesamt 103 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsereignisse wurden bei dem aktuellen Probenset 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 64 Teilnehmern die Verwendung der Insertionssequenz IS481 und von 5 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Autoimmun Diagnostika CAP *B. pertussis* (8x), HAIN GenoQuick Bordetella (7x), *B. pertussis/B.parapertussis* von Cepheid (2x), TibMolbiol LightMix BP (2x), Qiagen/Artus *B. pertussis* PCR Kit (1x), und Attomol *Bordetella* DNA-LINA (1x).

RV 533: *Helicobacter pylori*

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden positiven Proben # 1025331 ($\sim 10^5$ CFU/ml an *H. pylori*) und # 1025332 ($\sim 10^4$ CFU/ml) führte beim Nachweis von *H. pylori* DNA zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten. Lediglich von einem der insgesamt 35 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die positive Probe # 1025332 und von einem weiteren Teilnehmer ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1025333 mitgeteilt. Diese Probe enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml), deren DNA mit den NAT-Testsystemen der übrigen 34 Teilnehmer offensichtlich keine "spezifischen" Amplifikationsprodukte erzeugte und somit auch korrekt als *H. pylori*-negativ bewertet wurde. Auch bei der Probe # 1025334, die lediglich eine Kultursuspension von *E. coli* enthielt, wurden von allen Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse berichtet. Daher schnitten sowohl die kommerziellen als auch die eigenentwickelten Testsysteme im aktuellen Ringversuch wieder einmal erfreulich gut ab.

Bis auf 9 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (u.a. 5 x GenoType Helico Kit von Hain Lifescience und 1 x Sacace Biotechnologies *H. pylori* Kit) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei 34 der 35 Teilnehmer beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitionskontrolle, und von keinem der Teilnehmer wurden in den Einzelproben des Ringversuchs Inhibitionsereignisse beobachtet.

Wie in der Testbeschreibung des RV 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori* Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen innerhalb der *H. pylori* 23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 24 der insgesamt 35 Teilnehmer mitgeteilt, und diese waren mit Ausnahme von einem Teilnehmer (der die *H. pylori* Zielorganismen in der Probe # 1025332 als Clarithromycin-sensibel bewertet hatte) durchwegs korrekt. Die Zielwerte für die molekularbiologische Resistenztestung der ausgesandten Isolate sind in Tabelle 1 aufgeführt. In diesem Zusammenhang ist anzumerken, daß wir für den aktuellen Ringversuch ein interessantes *H. pylori*-Isolat mit "Doppelmutation" ausgewählt haben (Probe # 1025332). Da es sich bei diesem Isolat nachweislich um eine Reinkultur handelte, liegen hier offensichtlich unterschiedliche Clarithromycin-resistenzvermittelnde Mutationen (GGA unbd GTA) an der gleichen Nukleotid-

Position auf den unterschiedlichen intragenomischen Kopien der *H. pylori* 23S rDNA (Multicopy-Gen) vor.

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). Dennoch haben wir uns bei dem aktuellen Ringversuch entschlossen, drei positive Proben eines klinischen EHEC Isolats in einer Art Verdünnungsreihe auszusenden.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1025341; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml; *E. coli*, klinisches Isolat, *stx1*-positiv, *stx2c*-positiv, *eae*-positiv und *hlyA*-positiv), eine Probe mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1025342; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1025344; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1025343), die ausschließlich *E. coli* (*eae*- und *hlyA*-negativ) und humanes Zellmaterial als Probenmatrix enthielt. Abgesehen von der relativ gering konzentrierten Probe # 1025344 (ca. 10^3 CFU/ml) führte die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten - sowohl für positive als auch für negative Befunde. Aus Sicht des Ringversuchsleiters zeigten sich diesmal keine besonderen Auffälligkeiten hinsichtlich der Performance bestimmter Testkonzepte. Bis auf einen Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die relativ stark positive Probe # 1025341, drei Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die etwas schwächer positive Probe # 1025342 sowie 11 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für die relativ schwach positive Probe # 1025344 wurden hier durchwegs richtige PCR/NAT-Befunde übermittelt.

Bei einer Menge von 10^3 CFU/mL an EHEC Zielorganismen (entspricht ca. 10^2 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 μ l) nähern wir uns offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1025344 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.

Einer der Teilnehmer berichtete ein falsch-positives Ergebnis bei Probe # 1025543 - hierbei handelt es sich vermutlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung.

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

Die Mehrzahl der Teilnehmer gab die Verwendung von selbstentwickelten oder "anderen" Testsystemen mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC an, und bei keiner der ausgesandten Proben wurden signifikante Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Zudem wurden von 63 der insgesamt 69 Teilnehmer die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des gezielten Nachweises von Intimin- (*eae*) und/oder Enterohämolysin (*hlyA*)-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig

durchgeführt wurde und bei einigen Teilnehmern mit den jeweils eingesetzten molekularbiologischen Testsystemen kein Ergebnis bei der schwach konzentrierten Probe # 1025344 erhalten werden konnte, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, durchwegs korrekt.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu stricto 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 im letzten Ringversuch die analytische Sensitivität der eingesetzten NAT-Testsysteme über die Aussendung einer Art Verdünnungsreihe von *B. afzelii* ermittelt wurde, wollten wir uns im aktuellen Ringversuch wieder einmal auf die Abprüfung der analytischen Spezifität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto Stamm PKa2 (# 1025352, $\sim 1 \times 10^6$ Organismen/mL), eine Probe mit einer etwas niedrigeren Menge an *Borrelia bavariensis* Stamm BBi (# 1025351, $\sim 1 \times 10^4$ Organismen/mL; um diese erst vor kurzem neu beschriebene Spezies auch etwas ins Bewusstsein der Ringversuchsteilnehmer und diagnostischen Laboratorien zu rücken), eine Probe, die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt (# 1025353) sowie eine Probe mit einer nennenswerten Menge an *Borrelia miyamotoi* (# 1025354).

Die diesmal ausgesandten *Borrelia*-Spezies unterscheiden sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene, in gewissem Umfang von anderen Spezies innerhalb der *B. burgdorferi* s.l. Gruppe. Neben *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. afzelii* zählt auch *B. bavariensis* zu den in unseren Breiten vorkommenden Borrelien-Spezies mit bekanntermaßen humanpathogener Relevanz.

Die mit ca. 10^6 Organismen pro mL relativ stark positive Probe # 1025352 (*B. burgdorferi* sensu stricto PKa2;) wurde diesmal von 98 der insgesamt 99 Teilnehmer als (richtig) positiv befundet. Probe # 1025351 des aktuellen Sets enthielt mit ca. 10^4 Organismen pro mL eine etwa hundertfach geringere Menge an *B. bavariensis*, deren DNA von 96 Teilnehmern mit ihren jeweiligen Borrelien-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Zwei der 3 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1025351 verwendeten dabei ein LightCycler bzw. TaqMan *real-time* PCR Protokoll mit dem Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz und einmal wurde die Verwendung eines *nested* Block-Cycler PCR-Protokolls zur Amplifikation von spezifischen Bereichen "eines ribosomalen Gensegments" und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte angeführt.

Erfreulicherweise wurden diesmal bei der negativen Probe # 1025353, die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt, keine falsch-positiven Ergebnisse berichtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Etwas interessanter gestaltete sich die Ergebnislage bei der Probe # 1025354, die diesmal eine nennenswerte Menge der zu den Rückfallfieber Borrelien – also **nicht** zum *B. burgdorferi* sensu lato Komplex - zählenden *Borrelia miyamotoi* enthielt. Wie in Tabelle 2 der statistischen Auswertung dargestellt, wurde diese Probe von 12 der insgesamt 99 Teilnehmer als (falsch) positiv befundet.

Aufgrund der momentan noch unzureichenden Bekanntheit bzw. methodischen Abgrenzung dieser Spezies von den etwas populäreren und humanpathogenen Vertretern innerhalb der *B. burgdorferi* s.l. Gruppe wurden die für die Probe # 1025354 mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die offizielle Bewertung für die Erteilung der Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die

beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Ringversuchsteilnehmer, die diese Probe als "positiv" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlass nehmen, die Spezifität der aktuell eingesetzten Amplifikations- und Detektionskomponenten (z.B. Primer- und Sondensequenzen) ihrer jeweiligen Testsysteme zu überprüfen oder sich gegebenenfalls deren technische Limitationen vor der Ausformulierung von entsprechenden Befundkommentaren bewusst machen.

Erneut haben wieder über die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde im Rahmen dieser Ringversuchsrunde dabei lediglich von einem der Teilnehmer bei einer Einzelprobe 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 (3x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (3x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (2x), und Qiagen artus Borrelia LC PCR Kit (1x).

Kommentar zum aktuellen Borrelien-PCR Ringversuch von Dr. Volker Fingerle und PD Dr.

Andreas Sing (Nationales Referenzzentrum für Borrelien und Konsiliarlabor für Ehrlichien am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; Sollwertlabor für INSTAND e.V. Ringversuch RV 535). Erfreuliche Resultate des aktuellen Ringversuchs zum molekulargenetischen Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. waren zum Einen dass, im Gegensatz zu früheren Ringversuchen, keine Kontaminationen berichtet wurden und zum Anderen dass *B. burgdorferi* s.s. sowie die neu definierte Spezies *B. bavariensis* von nahezu allen Teilnehmern zuverlässig nachgewiesen wurden. Bei *B. bavariensis* handelt es sich im Übrigen um den früher *B. garinii* zugerechneten OspA-Typ 4, der mittels MLST als eigenständige Genospezies definiert wurde, entsprechend auch dem unterschiedlichen Wirtsspektrum: Für *B. bavariensis* sind insbesondere Mäuse als Wirte bekannt, während für *B. garinii* Vögel als Wirte dienen.

Weniger erfreulich war dagegen die hohe Rate falsch positiver Resultate für *B. miyamotoi*. Nachdem diese Spezies nur wenig bekannt ist, an dieser Stelle ein kurzer Erregersteckbrief. Neben *B. theileri* und *B. lonestari* wird *B. miyamotoi* den durch Schildzecken übertragenen Rückfallfieber Borrelien zugerechnet. Sie kommt in Asien (Erstbeschreibung 1995), Amerika und Europa vor und wird von den selben Ixodes Spezies wie *B. burgdorferi* übertragen, bei uns durch *I. ricinus*, den gemeinen Holzbock. Die Infektionsraten der Zecken sind meist zwischen 1% und 5%. Als Wirte wurden Nagetiere (insbesondere Mäuse), aber auch größere Säugetiere wie Schafe und Hirsche identifiziert. Bei effizienter transovarierlicher Übertragung gilt die Zecke nicht nur als Vektor sondern auch als Wirt. Die Anzucht des Erregers ist mit BSK-Medium möglich, gelingt aber nicht zuverlässig. Grobmorphologisch ist *B. miyamotoi* nicht von anderen Borrelien zu unterscheiden. In den Säugerwirten werden im Gegensatz zu *B. burgdorferi* hohe Erregerkonzentrationen im Blut erreicht. *B. miyamotoi* gilt dabei als nicht humanpathogen.

Schon aus epidemiologischen Gründen muss eine PCR auf *B. burgdorferi* s.l. deshalb ohne Frage auf Reaktivität mit Rückfallfieber Borrelien – speziell *B. miyamotoi* – getestet werden. Nicht nur, dass in Hautbiopsien ätiologisch irrelevante *B. miyamotoi* fälschlicherweise als „*B. burgdorferi* s.l.“ DNA klassifiziert werden könnte, besteht insbesondere bei der explizit nicht empfohlenen Untersuchung von vom Menschen entfernten Zecken die Gefahr, Patienten unnötigerweise einer potentiell schädlichen Antibiotikatherapie auszusetzen. Wir möchten deshalb dringend empfehlen,

die analytische Spezifität auch mit Rückfallfieber Borrelien zu definieren und ggf. entsprechende Hinweise in den Befundtexten zu integrieren.

In diesem Zusammenhang ist geplant, den interessierten Anwendern für Validierungszwecke ein Panel, das die für Europa relevanten *B. burgdorferi* s.l. Spezies und Rückfallfieber Borrelien beinhaltet, in definierter Menge zur Verfügung zu stellen. Um den Bedarf abschätzen zu können, möchten wir Sie auch weiterhin bitten, sich bei Interesse mit einer kurzen Nachricht an den Ringversuchsleiter zu wenden.

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 eine relativ stark positive Probe # 1025364, die mit einer Menge von ca. 10^5 CFU/mL an *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 versetzt war. Die Proben # 1025362 und # 1025363 des aktuellen Sets enthielten jeweils 10^5 CFU/mL bzw. 10^4 CFU/mL an *Legionella bozemanae* (vormals: *L. bozemanii*). Die „negative“ Probe # 1025361, die im aktuellen Probenstet neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli* enthielt, wurde erfreulicherweise von allen Teilnehmern als negativ befundet. Dies spricht wieder einmal für ein erfreulich gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Die Probe # 1025364 des aktuellen Sets enthielt eine relativ hohe Menge an Zielorganismen ($\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL *L. pneumophila* Serogruppe 1), die erfreulicherweise von 61 der insgesamt 64 Teilnehmer mit ihren NAT-gestützten Testsystemen zuverlässig nachgewiesen werden konnten. Lediglich 3 Teilnehmer berichteten bei dieser relativ stark positiven Probe ein falsch-negatives NAT-Ergebnis. Angesichts der hohen Menge an *L. pneumophila* in diesem Probenmaterial steht wohl außer Frage, daß die betroffenen Ringversuchsteilnehmer ihre Probenaufbereitungsverfahren, die verwendeten Zielsequenzen und/oder NAT-Testsysteme mit offensichtlich unzureichender analytischer Sensitivität umgehend überprüfen und verbessern sollten.

Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, enthielten 2 der 4 Proben (# 1025362 und # 1025363) diesmal eine nennenswerte Menge an *Legionella bozemanae* (vormals: *L. bozemanii*). Bei der Mehrzahl der Teilnehmer führte dies erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen. Nur bei 10 bzw. 6 der insgesamt 64 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen - unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier siebenmal die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls, zweimal der Einsatz von nicht näher spezifizierten BlockCycler Protokollen, sowie von einem Teilnehmer die Verwendung eines kommerziellen Testsystems mit dem *mip* Gen als *L. pneumophila*-spezifische Zielsequenzen angegeben. Da sich *Legionella bozemanae* zumindest auf Ebene der 16S rDNA Sequenz jedoch in zahlreichen Nukleotidpositionen von *L. pneumophila* unterscheidet, sollten hier von den entsprechenden Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis die Annealingbedingungen sowie die Hybridisierungsregionen der verwendeten Primer und/oder Sonden überprüft und nachgebessert werden. Zumindest bei den 61 der insgesamt 64 Ringversuchsteilnehmern, die in der

Zusammenschau der Ergebnisse für die *L. pneumophila*-positive Probe # 1025364 ein (richtig) positives Ergebnis berichtet haben, wurden die für die Proben # 1025362 und # 1025363 mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die offizielle Bewertung für die Erteilung der Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** Eine vergleichbare Probenkonstellation war bereits im Ringversuch RV 536: *Legionella pneumophila* vom November 2009 gegeben. Dort haben wir ebenfalls versucht, über eine Probe mit der zum Zielorganismus eng verwandten Spezies *Legionella bozemanii* (vormals: *L. bozemanii*) die Spezifität der von den Teilnehmern eingesetzten Testsysteme abzutesten. Interessanterweise wurden damals von 8 der insgesamt 66 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse für die *L. bozemanii* Probe mitgeteilt und in diesem Zusammenhang ausschließlich die Verwendung von eigenentwickelten *L. pneumophila*-spezifischen Testsystemen angegeben. Offensichtlich haben nicht alle der betroffenen Laboratorien die falsch-positiven Ergebnisse im *Legionella pneumophila* PCR Ringversuch vom November 2009 zum Anlaß genommen, ihre Testsysteme zu überprüfen und zu verbessern. Daher bleibt dem Ringversuchsleiter jetzt nur zu hoffen, daß die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs einen zusätzlichen Ansporn für die betroffenen Teilnehmer darstellt und sie hinsichtlich der analytischen Spezifität ihrer eigenentwickelten Testsysteme etwas nachbessern. Denn es ist nicht auszuschließen, daß sich in einem der kommenden Ringversuchsrunden auch wieder die eine oder andere "verwandte" Legionellen-Spezies findet, und jetzt haben wir bei der Erteilung entsprechender Zertifikate schon "beide Augen zugedrückt"...

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 18 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Ein Teilnehmer gab hier die Verwendung des neuen BD ProbeTec Legionella Testsystems an (Code [26] auf dem Ergebnisformular) und erzielte damit eine Richtigkeitsquote von 100 %, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben. Leider wurden von den übrigen 17 Teilnehmern die Hersteller der entsprechenden Testkits im Auswertungsbogen nicht durchgehend spezifiziert. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Gen ID CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (7x), TibMolbiol LightMix *Legionella* (3x), LEGD-LC von PIIM (2x), Argene Chlamydege (1x), LCD Array Kit (1x), Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (1x) und GeneProof LP PCR detection Kit (1x). Von den übrigen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet, und von keinem der 64 Teilnehmer wurde bei dem aktuell versandten Probenstet ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

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

RV 537: *Salmonella enterica*

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1025371; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1025374; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1025373; *Salmonella enterica* ser. Typhi, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1025372), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die insgesamt relativ hohe Menge an Zielorganismen in den *Salmonella enterica*-positiven Proben # 1025371, # 1025373, und # 1025374 sowie 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 *Escherichia coli* Isolat in Probe # 1025372 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 5 Teilnehmern, mit Ausnahme eines isolierten falsch-positiven Befundes, keine weiteren falsch-positiven Befunde und auch keine falsch-negativen Befunde mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit bei annähernd 100 %. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: IQ-Check *Salmonella* II Kit der Fa. BioRad (1x).

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

RV 538: *Listeria* spp.

Neben der wohl prominentesten Spezies *Listeria monocytogenes* sind auch eine Reihe weiterer Listerienspezies bekannt, für die inzwischen auch einige selbstentwickelte und kommerzielle NAT-gestützte Nachweisverfahren zur Verfügung stehen. Auch wenn diese Spezies (mit Ausnahme von *L. ivanovii*) zumeist nicht von humanpathogener Relevanz sind, werden wir uns bei der Konzeption des Probenmaterials für RV 538 vor allem zur Abprüfung der Spezifität individueller Testsysteme nicht nur auf *L. monocytogenes* beschränken. Daher werden gelegentlich auch andere Listerienspezies in der einen oder anderen Probe dieses Ringversuchs zu finden sein. So wie im Fall der Probe # 1025382, die diesmal eine relativ hohe Menge an *L. innocua* enthielt. Im Gegensatz zu einigen der vorhergegangenen Ringversuche, bei denen durch die nahezu ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen bestimmte Proben bei keinem der Teilnehmer zu positiven Ergebnissen geführt hatte, wurde die Probe mit *L. innocua* diesmal zumindest von zwei der insgesamt 24 Teilnehmer als positiv für *Listeria* spp. DNA getestet. Hintergrund dieser zumindest auf den ersten Blick etwas irritierenden Ergebniskonstellation in der statistischen Auswertung (Tabelle 2) ist die fast ausschließliche Verwendung von *L. monocytogenes*-spezifischen NAT-Testsystemen, die keine selektive Detektion bzw. differenzierte Erfassung von non-*monocytogenes* Listerienspezies erlauben. Im Umkehrschluß spricht diese Datenlage dann für eine erfreulich hohe Spezifität der eingesetzten *L. monocytogenes*-spezifischen Testsysteme bei 22 der insgesamt 24 Teilnehmer. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein ***L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Im aktuellen Ringversuch sollte über die Aussendung von zwei Proben mit relativ geringen Mengen an *L. monocytogenes* Zielorganismen wieder einmal die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abgeprüft werden. Probe # 1025381 enthielt folglich mit $\sim 1 \times 10^3$

CFU/mL eine relativ geringe Menge an *L. monocytogenes*, die erfreulicherweise von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich einer der insgesamt 24 Teilnehmer berichtete hier ein negatives Ergebnis - vermutlich wurde in diesem Fall ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität verwendet. Mit ca. 1×10^2 CFU/mL *L. monocytogenes* pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1025383 diesmal eine sehr geringe Menge der entsprechenden Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde selbst diese schwach-positive Probe noch von 18 der insgesamt 24 Teilnehmer als "positiv" befundet. Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden bei dieser Probe die mitgeteilten Ergebnisse nicht in die offizielle Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1025384), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet.

Da wir uns innerhalb dieses Ringversuchsprogramms gelegentlich auch mit einzelnen Proben an die derzeit technisch machbare untere Nachweisgrenze annähern wollen (Anmerkung: wir sind uns dabei sehr wohl bewusst, daß bei vielen Fragestellungen das "technisch machbare" nicht unmittelbar gleichbedeutend mit dem "diagnostisch sinnvollen" ist), bestand beim aktuellen Listerien-Ringversuch die diagnostische Herausforderung in der Abprüfung der analytischen Sensitivität individueller Testkonzepte. Der möglichst selektiven Detektion bzw. differenzierten Erfassung von non-monocytogenes Listerienspezies werden wir uns wieder in einigen der zukünftigen Ringversuchsrunden widmen.

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

Von allen 26 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchproben wurden nicht beobachtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TibMolbiol LightMix *Listeria monocytogenes* (1x).

RV 539: MRSA

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

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsdiskussion schon mehrfach ausgeführt, gewinnt der molekularbiologische Direktnachweis von MRSA im Umfeld der medizinischen Mikrobiologie zunehmend an Attraktivität. Aktuell sind bereits von 6 namhaften Herstellern NAT-gestützte Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar oder befinden sich gerade im Stadium der Zulassung. Deren Verwendung wird im Zuge dieses Ringversuchs auch systematisch abgefragt. Die Auswertung der aktuellen Ergebnisse zeigt erneut die spezifischen Limitationen der unterschiedlichen Testformate und -konzepte. Bedingt durch die diagnostische Fragestellung

bestehen die spezifischen Anforderungen hier in einem möglichst sensitiven Nachweis von geringsten Mengen an Zielorganismen und gleichzeitig in der differenzierten Erfassung von *mecA*-positiven Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies.

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

Daß aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte bereits im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden unter anderem einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder anderen genetischen Variationen versandt. Da wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben, primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzutesten, befanden sich im aktuellen Ringversuch wieder einmal typische Mischungen aus Methicillin-resistenten sowie -sensiblen *S. aureus* Isolaten und jeweils Koagulase-negativen Staphylokokken. Nach der Aussendung des sogenannten „Züricher Drogenstamms“ mit einer wohl eher ungewöhnlichen SCC*mec*-orfX Region im letzten Ringversuch (April 2010) mit dem Resultat von vielen falsch-positiven Ergebnissen unter den Teilnehmern mit SCC*mec*-basierten Testsystemen haben wir uns diesmal (zugegebenermaßen auch aus "edukativen" Gründen) dazu entschlossen, in einer der gemischten Proben ein *S. aureus* Isolat mit Deletion im *mecA* Gen (sog. *mecA* drop-out Mutante) auszusenden. Daher ist auch im aktuellen Ringversuch wieder eine interessante Ergebniskonstellation zu erwarten: wie in Tabelle 1 der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt Probe # 1025391 ein Gemisch aus einer relativ hohen Menge eines typischen MRSA Isolats (MRSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) und einer Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-negativ, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Probe # 1025392 enthielt ein Gemisch aus dem besagten *S. aureus* Isolat: eine sog. *mecA* drop-out Mutante, die zwar bestimmte Segmente einer SCC*mec* Kassette aber ohne *mecA* Gen oder ohne phänotypisch funktionelles *mecA* Genprodukt enthält (MSSA; PVL-negativ; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml), zusammen mit einer Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-negativ, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Ähnlich wie die erste Probe enthielt auch Probe # 1025393 ein Gemisch aus einem PVL-positiven MRSA Isolat (cMRSA; PVL-positiv; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) und einer Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-negativ, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Die letzte der 4 Proben (# 1025392), enthielt nur nennenswerte Mengen einer Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-negativ, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Erfreulicherweise wurden diesmal für die negative Probe # 1025394 von allen der insgesamt 189 Teilnehmer durchwegs korrekt negative Resultate mitgeteilt (siehe Tabelle 2). Dies spricht wieder einmal für ein überzeugend gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen.

Auch die Probe # 1025393 mit einer Mischung aus einem PVL-positiven MRSA Isolat und einer Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies wurde erfreulicherweise ebenfalls nahezu von allen Teilnehmern mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt befundet. Lediglich 6 Teilnehmer berichteten hier ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis. Von 5 dieser 6 Teilnehmer wurde die Verwendung eines NAT-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruht. Da mit

dieser Art von Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA* Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, ist in diesem Fall "fraglich" auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis.

Eine ähnliche Erregerkonstellation war auch in der aktuellen Probe # 1025391 gegeben. Die in dieser Probe befindliche Mischung aus einem PVL-negativen MRSA Patientenisolat und einer Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies wurde ebenfalls von dem überwiegenden Teil der Ringversuchsteilnehmer mit den jeweils eingesetzten Testsystemen korrekt als MRSA-positiv befundet. Im Unterschied zur Probe # 1025393 berichteten aber hier 14 Teilnehmer ein falsch-negatives Ergebnis und ebenfalls 6 Teilnehmer ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis. Von 5 dieser 6 Teilnehmer wurde wiederum die Verwendung eines NAT-Testsystems angegeben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruht. Wie bereits zuvor ausgeführt, ist bei diesem speziellen Testkonzept "fraglich" auch das wissenschaftlich korrekte Untersuchungsergebnis für diese Probe.

Den 14 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis für Probe # 1025391 ist jedoch dringend anzuraten, ihre Testsysteme zu überprüfen. Angesichts der relativ hohen Menge an Zielorganismen kann die Mitteilung eines falsch-negativen Ergebnisses bei dieser Probe nicht mit mangelnder Sensitivität entschuldigt werden. Selbst wenn das entsprechende Zertifikat erteilt werden sollte (1 falsches Ergebnis bei den 4 Einzelproben wird ja bekanntermaßen toleriert), so sollten die betroffenen Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis diesen Ringversuch zum Anlaß nehmen, um die Auswahl ihres Testsystems zu hinterfragen und die Funktionalität ihrer Testkomponenten sicherzustellen.

Im Vergleich zu den 3 anderen Proben gestaltet sich die Ergebnislage für Probe # 1025392, die diesmal neben einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies ein "interessantes" *S. aureus* Isolat mit Deletion im *mecA* Gen (sog. *mecA* drop-out Mutante) enthielt, erwartungsgemäß etwas komplexer. Mit der zunehmenden Implementierung von schnellen und möglichst zuverlässigen NAT-gestützten Verfahren zum MRSA Direktnachweis sind inzwischen eine Vielzahl mehr oder weniger gut evaluierter *in-house* Testkonzepte sowie einige kommerzielle Testsysteme namhafter Diagnostikfirmen verfügbar, die auf dem gezielten Nachweis einer integrierten SCC*mec*-Kassette im *S. aureus* Genom beruhen. Um eine möglichst breite Abdeckung der genetisch unterschiedlichen SCC*mec* Kassettentypen zu erreichen, wird hier im Rahmen eines Multiplex-PCR Ansatzes mit einer relativ komplexen Mischung unterschiedlicher Primer- und SONDENSEQUENZEN gearbeitet, wobei die resultierende Sensitivität und Spezifität maßgeblich von der Auswahl der einzelnen Primersequenzen und deren Positionierung um die Integrationsstelle der jeweiligen SCC*mec* Kassette herum bestimmt wird. Die hohe diagnostische Wertigkeit dieser Zielsequenz bzw. Zielregion ist mittlerweile unumstritten – aber manchmal hat auch dieser Ansatz seine Tücken. Denn mit dem Nachweis einer integrierten SCC*mec* Kassette kann nur indirekt auf eine resultierende Methicillin-Resistenz durch das (üblicherweise) innerhalb der SCC*mec* Kassette anwesende *mecA* Gen geschlossen werden. Auch wenn *S. aureus* Stämme mit fehlendem oder nicht funktionellem *mecA* Gen zumindest in unseren Breiten nicht sehr häufig beobachtet werden, kann sich in Einzelfällen der getrennte *mecA* Gen Nachweis (ggf. zusätzlich zum spezifischen Nachweis einer SCC*mec* Kassette) als vorteilhaft erweisen und die Zuverlässigkeit der NAT-Ergebnisse erhöhen. Über die unterschiedliche "Brisanz" von falsch-positiven gegenüber falsch-negativen NAT Ergebnissen beim MRSA Screening wird zwar trefflich unter den Herstellern von verschiedenen kommerziellen Testkits diskutiert, aber da bei einer falschen Klassifizierung von bestimmten *S. aureus* Klonen deren ungehemmter Weiterverbreitung in Kliniken und anderen Gesundheitseinrichtungen nichts im Wege stehen dürfte, bleibt wohl unumstritten, daß in diesen Fällen das zeitgleiche Anlegen und die Auswertung konventioneller kultureller Nachweisverfahren wertvolle Zusatzinformationen und damit ein zusätzliches Plus an diagnostischer Sicherheit bietet. Auch im Rahmen der MRSA bzw. MSSA Isolate dieses Ringversuchs bleibt wieder einmal festzuhalten, daß allein aus Kostengründen oder der guten analytischen Sensitivität von PCR / NAT Verfahren nicht auf die zeitgleiche Durchführung von kulturellen Nachweisverfahren verzichtet werden darf.

In Anbetracht der genetischen Konstellation des MSSA Isolats in Probe # 1025392 werden die Vor- und Nachteile der derzeitigen Testkonzepte offenbar: während die allein auf dem Nachweis einer integrierten SCC*mec*-Kassette basierenden Testkonzepte hier konsequenterweise falsch-positive Ergebnisse für MRSA liefern, kann die andere Gruppe von Testsystemen, die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruhen, hier das "Fehlen" des *mecA* Gens anzeigen. In der mikrobiologischen Praxis wird aber auch sehr häufig die gleichzeitige Anwesenheit einer Methicillin-resistenten (also *mecA*-positiven) Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies in dem entsprechenden Abstrichmaterial beobachtet. In diesem Fall könnten letztere Testsysteme die Herkunft des *mecA* Gens in der Gesamt DNA-Präparation nicht der entsprechenden Spezies zuordnen und (wie im Fall der beiden Proben # 1025391 und # 1025393) zu fraglichen, also in der klinischen Praxis nicht wirklich hilfreichen Befunden, führen. Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1015392 differenziert betrachtet, dann wird dieser Umstand schnell ersichtlich. Während die getrennte Dektion von Spezies- und Resistenzmarkern bei einigen der Teilnehmer zu "fraglichen" bzw. "nicht interpretierbaren" Ergebnissen führte, lieferten alle der derzeit etablierten SCC*mec*-basierten Testsysteme bei diesem MSSA Isolat falsch-positive MRSA Ergebnisse, die in diesem Fall auch das technisch korrekte Untersuchungsergebnis darstellen (die im *S. aureus* Genom ja tatsächlich integrierte SCC*mec* Kassette wurde korrekt detektiert). Daher haben wir uns bei der Erstellung der Zertifikate diesmal entschlossen, bei Spezifizierung des verwendeten Testsystems ein negatives Ergebnis für die besagte Probe # 1015391 fairerweise nicht als "falsch-negativ" zu bewerten. Abgesehen von der zuletzt diskutierten Probe spricht die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 54 der insgesamt 189 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und bis auf 2 Ergebnisse 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.

RV 540: *Chlamydia (Chlamydophila) pneumoniae*

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1025402; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1025401; *C. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1025404; *C.*

pneumoniae, $\sim 5 \times 10^3$ IFU/ml), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1025403), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen 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 Analysesysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tabelle 2 aufgeführten Daten ist zu entnehmen, daß auch nahezu alle Teilnehmer die Zielorganismen in den drei positiven Proben # 1025401, # 1025402 und # 1025404 sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Auffällig ist hier das besonders gute Abschneiden der kommerziellen Testsysteme im Vergleich zu einigen selbstentwickelten (*in house*) Protokollen. Erfreulicherweise wurden auch für die negative Probe # 1025403 bis auf ein als "fraglich" klassifiziertes Ergebnis, durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Als „kleiner Wermutstropfen“ sind lediglich die sporadischen falsch-negativen Ergebnisse bei den *C. trachomatis*-positiven Proben zu nennen. Da diese Proben auch jeweils eine nennenswerte Menge an Zielorganismen enthielten, sind die falsch-negativen Ergebnisse bei den entsprechenden Teilnehmern entweder auf die Verwendung von unzureichend effizienten Verfahren zur Nukleinsäureisolierung und/oder den Einsatz von NAT-gestützten Testsystemen mit wirklich ausgeprägten Sensitivitätsproblemen zurückzuführen. Aber wir wollen nicht dramatisieren - schließlich waren diesmal 300 der insgesamt 312 mitgeteilten Einzelergebnisse korrekt, und das ist doch für alle Beteiligten wieder einmal höchst erfreulich.

Bis auf 31 Teilnehmer haben alle 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 nur von je einem Teilnehmer bei je einer Einzelprobe des gesamten Sets 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. Das in dieser Ringversuchsserie mit einer eigenen Codenummer aufgeführte und seit kurzem auch kommerziell verfügbare LightMix *C. pneumoniae* real-time PCR Testsystem der Fa. TIB Molbiol, Berlin, wurde diesmal von 9 Teilnehmern verwendet. Mit diesem Testsystem konnten die Teilnehmer alle 4 Proben dieses Ringversuchs korrekt analysieren und detektieren – und die entsprechenden Richtigkeitsquoten lagen hier bei 100 %.

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 (7x), GenProof *C. pneumoniae* PCR Kit (2x), CHLPD-LC von PIIM (2x), BD Probe Tec *Chlamydia* spp. (2x), Duplica Real Time *C. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x) und Argene Chlamylege (1x).

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

Aufgrund zahlreicher Rückfragen von Teilnehmern des vergangenen Ringversuchs hier eine wichtige Anmerkung vorab: der Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Mycoplasma pneumoniae* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Mycoplasma pneumoniae* DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut, wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial, konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten (auch wenn im aktuellen Set von Ringversuchsproben ausnahmsweise keine dieser schwach positiven Proben enthalten war).

Da NAT-gestützte Verfahren zum Direktnachweis geringer Mengen an *Mycoplasma pneumoniae* aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterial vor allem zur differentialdiagnostischen Abklärung respiratorischer Infektionen zunehmend an Aktualität gewinnen, sind bereits einige Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar. Deren Verwendung wird im Zuge dieses Ringversuchs auch systematisch abgefragt und die entsprechenden Ergebnisse sind als Richtigkeitsquoten in der statistischen Auswertung in Tabelle 3 nach dem jeweiligen Testsystem aufgeschlüsselt.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal nur eine positive Probe: Probe # 1025412 mit einer wirklich sehr hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*, $\sim 5 \times 10^6$ Genomkopien/mL). Um die Spezifität der Testsysteme abzutesten enthielten Probe # 1025411 und Probe # 1025413 diesmal nennenswerte Mengen an *M. genitalium* als eine zum Zielorganismus verwandte Spezies ($\sim 1 \times 10^6$ und $\sim 1 \times 10^5$ Genomkopien/mL). Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1025414), die nur humane Zellen und *E. coli* enthielt. Insgesamt betrachtet wurden im Rahmen des aktuellen Probensets von den Teilnehmern wieder durchwegs hohe Richtigkeitsquoten erzielt.

So konnten diesmal alle 86 Teilnehmer in der relativ stark positiven Probe # 1025412 die DNA der *M. pneumoniae* Zielorganismen problemlos und zuverlässig nachweisen.

Mit Ausnahme eines Teilnehmers, der sein Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert hat, und zwei Teilnehmern, die die negative Probe # 1025414 als (falsch) positiv befundet haben, wurden von den 86 teilnehmenden Laboratorien für diese beiden Proben durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet. Dies spricht u.a. auch für ein gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen. Etwas anders stellt sich die Ergebniskonstellation für die restlichen beiden Proben des aktuellen Sets dar. Um im Rahmen der Möglichkeiten dieses Ringversuchskonzepts auch die Spezifität der eingesetzten Testsysteme abzutesten, enthielten diese zwei Proben (# 1025411 und # 1025413) diesmal eine nennenswerte Menge an *M. genitalium* als verwandte Spezies, was bei der Mehrzahl der Teilnehmer erfreulicherweise zu keinen falsch-positiven NAT-Ergebnissen führte. Lediglich 9 bzw. 8 der insgesamt 86 Teilnehmer berichteten hier ein (falsch-)positives Ergebnis und zwei Teilnehmer klassifizierten ihr Ergebnis für diese beiden Proben als „fraglich“.

Wie bereits bei einigen der vorhergegangenen Ringversuche ausgeführt, sollte ein falsch-positives Ergebnis bei den *M. genitalium* Proben den entsprechenden Teilnehmern Anlaß zur kritischen Überprüfung des jeweiligen Testsystems geben. Auch wenn es sich hier um einen relativ neu eingeführten Ringversuch handelt und umfassende Erfahrungswerte aus früheren Ringversuchsrunden noch fehlen, so zeigt die Auswertung der Ergebnisse bereits deutlich auf, daß auch die Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *M. pneumoniae* DNA relativ hoch zu sein scheint (siehe Tabelle 3). Bei 9 der insgesamt 86 Teilnehmer zeigten sich offenkundige Spezifitätsprobleme bei den eingesetzten Testsystemen, die im Ergebnisformular als "in-house PCR assay" oder "Andere" klassifiziert wurden. Unter der Rubrik "Zielsequenz" wurde hier die Verwendung ribosomaler Zielsequenzen unter Einsatz eines eigenentwickelten real-time PCR Protokolls angegeben. Obwohl sich *M. genitalium* (wie auch *M. orale* aus dem vorhergegangenen Ringversuch) auf Ebene der 16S rDNA Sequenz von *M. pneumoniae* unterscheidet, sollten die Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis überlegen, eine geeignetere Zielsequenz zu wählen oder eine Sequenzierung eines positiven Amplifikationsproduktes zur Spezifitätsüberprüfung anschließen. Das für das P1-Adhäsion kodierende Gen hat mit dem MgPa Gen von *M. genitalium* gemeinsame Sequenzbereiche, sodaß die Annotierung bzw. Primerauswahl bei Verwendung dieser Zielsequenz geprüft werden sollte (siehe Literatur am Ende des Artikels). In diesem erstmalig durchgeführten Ringversuch werden bei der Erstellung der Zertifikate aufgrund der engen phylogenetischen Verwandtschaft von *M. pneumoniae* und *M. genitalium* die Ergebnisse bei Verwendung der ribosomalen Zielsequenzen nicht als falsch bewertet.

Die im Rahmen dieser Ringversuchsserie mit eigenen Codenummern aufgeführten kommerziellen Testsysteme TIB Molbiol LightMix *M. pneumoniae* (5 Teilnehmer), Qiagen *M. pneumoniae* LC PCR Kit (7 Teilnehmer), sowie Minerva Venor Mp (5 Teilnehmer) konnten erfreulicherweise

erneut mit durchwegs korrekten Ergebnissen und hohen Richtigkeitsquoten überzeugen. Da müssen zukünftig manche Teilnehmer mit eigenentwickelten (in-house) Testsystemen wohl noch etwas nachziehen. Die diagnostische Performance eines etablierten *in-house* Protokolls und ausgewählter kommerzieller NAT-Testsysteme zum Nachweis von *M. pneumoniae* DNA wurde kürzlich im Rahmen einer systematischen Studie untersucht. Auch hier erwiesen sich diese Testsysteme als spezifisch, sensitiv und auch zuverlässig bezüglich der Erfassung aller relevanten *M. pneumoniae* Subtypen und Varianten: Dumke, R. und E. Jacobs (2009) Comparison of commercial and in-house real-time PCR assays used for the detection of *Mycoplasma pneumoniae*. J. Clin. Microbiol. 47: 441-444.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: CAP Bac Kit von Autoimmun Diagnostika (5x), MYPD-LC von PIIM (2x), BD Probe Tec *M. pneumoniae* (2x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (1x), Argene Chlamylege (1x), LCD Array Kit (1x), Minerva Biolabs Venor MP-QP (1x), und Duplica Real Time *M. pneumoniae* Detection Kit der Fa. Euroclone (1x).

RV 542: *Coxiella burnetti*

Dieser neue Ringversuch wurde in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen und die erste Aussendung des Probenpanels wird im April 2011 stattfinden.

RV 543: *Francisella tularensis*

Dieser neue Ringversuch wurde in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen und die erste Aussendung des Probenpanels wird im April 2011 stattfinden.

December , 2010

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 541)

Dear Participant, dear Colleague,

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

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

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

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

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

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

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

With best personal regards,



PD 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

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

NOVEMBER 2010

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

The current set of QC samples contained two samples with various amounts of *N. gonorrhoeae* ($\sim 10^4$ CFU/mL in sample # 1025304; $\sim 10^3$ CFU/mL in sample # 1025302) and two samples with *C. trachomatis* organisms ($\sim 10^3$ IFU/mL in samples # 1025302 and # 1025304). The other two "negative" samples contained significant amounts of *Neisseria sicca* (# 1025301) and *Neisseria lactamica* (# 1025303). The latter two *Neisseria* strains were included in the current distribution since they are considered to potentially cross-react with certain GO-specific NAT assays.

Despite the relatively low amounts of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* target organisms in the current set of QC samples, the availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results. Among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 128 participants, only one false-positive and 9 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 8 participants for sample # 1025302 which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in a relatively low amount of $\sim 10^3$ CFU/mL. Five participants reported a false-negative result for sample # 1025304, which contained a 10-fold higher amount of *N. gonorrhoeae* target organisms. Interestingly, the assumed cross-reaction of certain GO-specific NAT assays with the related species *Neisseria sicca* (in sample # 1025301) and *Neisseria lactamica* (in sample # 1025303) was not as striking as expected. For the ease of interpretation, we created some extra tables where only the CT-specific results (table 4), the GO-specific results (table 5) and the false-negatives or false-positives sorted by the reported test system are depicted (table 6). As depicted in tables 5 and 6 of the statistical analysis, false positive results with *Neisseria lactamica* (sample # 1025303) were observed sporadically but not systematically by 2 of 19 participants using the BD ProbeTec test, one of 20 participants using the former version of the Roche COBAS AmpliCor, and by 7 of 45 participants indicating the use of "other commercial tests" or "in house assays". Only one participant, who indicated the use of a not precisely specified "*in-house* assay, observed a false positive results with *Neisseria sicca* (sample # 1025301).

With respect to the number of target organisms present in the current set of QC samples, it seems that the analytical sensitivity of some combined PCR / NAT assay concepts is slightly better for *C. trachomatis* organisms than for *N. gonorrhoeae* detection. This is further illustrated in tables 4 and 5, where the results are depicted by target organism (*C. trachomatis* and GO-specific detection). The practical significance of the slightly lower rates of true positive results observed with some commercial or prefabricated test concepts remains unclear. If these "effects" should be associated with the intrinsic diagnostic performance of such well-evaluated and well-standardized test concepts, it is astonishing that a remarkable portion of participants report correct results with the "affected" assays. So individual deviations from the recommended kit or test protocols or the recommended sample workup procedures are more likely explanations for the observed variations in the overall diagnostic performance of particular assays with the current set of distributed QC samples.

One last 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, especially this test presented with a relatively low analytical sensitivity in statistical analysis (tables 3 to 5).

This point has already been addressed several times in the discussions of our recent EQAS (external quality assessment) distributions: the simple reason is that their assay concept targets RNA molecules which are not completely stable in our sample production and processing workup. This aspect should be considered when new participants want to enroll in our comprehensive external quality assessment schemes for NAATs in diagnostic bacteriology.

RV 531: *Chlamydia trachomatis*

The current set of QC samples contained only one sample with *C. trachomatis* target organisms (# 1025313, $\sim 1 \times 10^3$ IFU/ml) and three samples without target organisms (# 1025311, # 1025312 and # 1025314; containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*). As depicted in table 2 of statistical analysis, false-negative results for sample # 1025313 (10^3 IFU/ml of *C. trachomatis*) were reported by 2 of the 115 participants and three false-positive results were reported for the other three "negative" samples of the current set. One of the two participants who missed the positive sample reported the use of the commercial BD ProbeTec test and the other participant reported the use of an "in house" PCR assay. Overall, a very good diagnostic performance was observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 115 participants of the current distribution.

RV 532: *Bordetella pertussis*

The current set of QC samples contained only one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1025322; 1×10^4 CFU/mL of target organisms), as well as three negative samples: one with *Bordetella bronchiseptica* (# 1025321; 1×10^3 CFU/mL), one with *Bordetella parapertussis* (# 1025324; 1×10^4 CFU/mL) and one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1025323). The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. However, 3 participants reported false-negative results for the *B. pertussis* sample # 1025322 ($\sim 10^4$ CFU/mL) and 4 participants observed false-positive results for the "negative" sample # 1025321 (containing about 10^3 CFU/mL of *B. bronchiseptica* organisms). Another 10 participants reported false-positive results for the "negative" sample # 1025324 (*B. parapertussis*; 1×10^4 CFU/mL). Nine of the affected laboratories have indicated the use of "other commercial tests" and another 5 participants indicated the use of "in-house PCR assays". For participants who have observed false-positive results with samples # 1025321 or # 1025324, it is strongly recommended to rule out the possibility of intralaboratory cross-contamination events and/or to initiate appropriate measures to improve the analytical specificity of their assay concepts. Switching to a more species-specific target gene may help to improve PCR assay performance.

All of the remaining results reported by the 103 participants were correct. Run controls were performed by 101 participants and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution.

RV 533: *Helicobacter pylori*

The current set of QC samples contained two samples with a relatively high amount of target organisms. Sample # 1025331 contained approximately 1×10^5 CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain, and sample # 1025332 contained approximately 10^4 CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study. All of the 35 participants reported positive results for sample # 1025331 and sample # 1025332 tested positive in the specific PCR assays of 34 from the 35 participants. One sample contained a culture suspension of the related species *Helicobacter mustelae* (# 1025333; $\sim 1 \times 10^3$ CFU/ml), which was reported "negative" by 34 of the 35 participants. This indicates a satisfactorily high level of assay specificity 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 24 participants –

with the exception of one result, they were all correct. As depicted in table 1, the current panel of strains included an interesting *H. pylori* strain which was isolated in the course of a therapy failure study. This particular strain (sample # 1025332) presented with a "**double mutation**" at a characteristic Clarithromycin resistance-mediating nucleotide position within the *H. pylori* 23S rDNA gene. Since we made sure that it was a pure (clonal) strain and not a mixture of different variants evolved in the presence of antibiotic pressure, this strain carries the respective **GGA** and **GTA** mutations at identical nucleotide positions within different intragenomic copies of its 23S rDNA genes. Considering that the 23S rDNA genes are present in multiple copies on the bacterial genome and Clarithromycin resistance-mediating mutations may occur sporadically in individual copies, such a situation is feasible and could pose a challenge to certain assay concepts for molecular resistance testing.

RV 534: EHEC / STEC

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of EHEC (*E. coli*, clinical isolate, *stx*₁-positive, *stx*_{2c}-positive, *eae*-positive and *hlyA*-positive): sample # 1025341 (1×10^5 CFU/ml), sample # 1025342 (1×10^4 CFU/ml) and sample # 1025344 (1×10^3 CFU/ml). Sample # 1025343 contained an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain. Overall, there was a pretty good diagnostic performance of the EHEC-specific assays used by the 69 participants and only 4 false negative results were observed for samples # 1025341 and # 1025342, containing about 10^5 and 10^4 CFU/ml of a clinical EHEC isolate, respectively.

The weak positive sample # 1025344, containing about 10^3 CFU/ml of the target organism (which corresponds to about 10^2 EHEC cells in a volume of 100 µl typically processed for template DNA preparation) was reported positive by 55 of the 69 participants. Taken into account, that the routine application of EHEC PCR is the molecular detection and characterization of Shiga Toxin genes in cultured material, we have scored a (false) negative result for this particular weak positive sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. 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 63 laboratories and, with the exception of laboratories who obtained no amplification products with the weak-positive sample # 1025344, all of the reported results were correct

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Due to numerous requests in the past, here is a short note for our participants outside Europe: as this proficiency testing panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples do not necessarily contain suspensions of "prototype" isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto and in many of the bi-annual rounds of our external quality assessment (EQAS) scheme also other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies will be present in individual samples. The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia bavariensis* (# 1025351; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL), one sample with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (sample # 1025352; $\sim 1 \times 10^6$ organisms/mL), and one sample containing significant amounts of *Borrelia miyamotoi* (# 1025354). Sample # 1025353 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

With the exception of 4 false-negative results for samples # 1025351 and # 1025352 (both contained significant amounts of *B. burgdorferi* sensu lato organisms) and 12 false-positive results for sample # 1025354 (*B. miyamotoi*), the *B. burgdorferi*-specific assays of the participants worked well. Inclusion of the *B. miyamotoi* strain was intentional to survey the analytic specificity of the various *Borrelia burgdorferi* -specific NAT assays currently applied in the diagnostic laboratories. For those among the readership who are not familiar with *B. miyamotoi*, here a short description. This species together with *B. theileri* and *B. lonestari* is close related to the relapsing fever (RF) borreliae on the basis of DNA sequences, but like *B. burgdorferi* use ixodid (hard) ticks as vectors, in Europe *I. ricinus*. *B. miyamotoi* occurs in Asia, Europe, and North America. Infection prevalences in questing nymphal ticks have ranged between 1% and 5%. Rodents but

also larger mammals like cattle and deer were identified as reservoirs. Unlike *B. burgdorferi*, but like several RF *Borrelia* species, *B. miyamotoi* is efficiently vertically transmitted from infected females to their offspring and ticks therefore also serve as hosts. Similarly to RF *Borrelia* species, *B. miyamotoi* achieves high densities in the blood of infected rodents, but is not regarded as human pathogen.

Therefore we urgently recommend to include RF borreliae, especially *B. miyamotoi*, when a PCR will be validated for analytical specificity.

In addition, no one of the 99 participants reported a false-positive result for the "negative" sample # 1025353 (which contained only non-infected human cells and *Escherichia coli*). Compared to the results observed during some of our previous RV 535 distributions, this fact is highly appreciated since it indicates a significant improvement with respect to the prevention of intra-laboratory or intra-assay contamination events.

RV 536: *Legionella pneumophila*

The current set of QC samples contained only one positive sample with *Legionella pneumophila* serogroup 1 (# 1025364; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL), as well as two samples containing *Legionella bozemanii* (# 1025362; $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL and # 1025363; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). Sample # 1025361 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells. With the exception of three false-negative results for sample # 1025364 the *L. pneumophila*-positive sample was tested positive by 61 of the 64 participating laboratories. As expected, a higher number of "false-positive" results were observed with samples # 1025362 and # 1025363, which contained significant amounts of *L. bozemanii*, a species closely related to the target organism of the *L. pneumophila* QC distribution. It is good to see that all but one of the participants using "commercial assays" reported (correct) negative results for the *L. bozemanii* samples. At least for the 61 participants, who have submitted correct results for the *L. pneumophila*-positive sample # 1025364, we have not scored a (false) positive result for the *L. bozemanii* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who observed such a cross-reaction with their in-house assays and are aiming at a high analytical performance should consider to improve the sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. Since no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1025361, 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 a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Typhi: sample # 1025371 contained 1×10^6 CFU/ml, sample # 1025374 contained 1×10^5 CFU/ml and sample # 1025373 contained 1×10^4 CFU/ml. Sample # 1025372 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

With the exception of a single false-negative result with sample # 1025374, 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 close to 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 (# 1025384; only *E. coli* cells), two samples positive for *L. monocytogenes* and one sample with *Listeria innocua* as a *Listeria* species other than *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 ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL) were present in sample # 1025381 and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays applied by 23 of the 24 participants. Although the second "positive" sample contained a remarkably low amount of target organisms (# 1025383; $\sim 1 \times 10^2$ CFU/mL of *L. monocytogenes*), it was nice to see that 18 of the 24 participating laboratories were still able to detect the corresponding DNA by their *Listeria*-specific PCR assays. By the way, we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, only the laboratory who has reported a false-negative result for positive sample # 1025381 should consider to improve the analytical sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concept.

To assess species coverage among those laboratories who are running *Listeria* genus-specific PCR assays, one sample of the current set contained a significant amount of *Listeria innocua* organisms (# 1025382; $\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL). It was tested negative by 22 of the 24 participating laboratories. But there is a simple reason for the striking portion of false-negative results: all but 4 participants indicated the exclusive use of a *L. monocytogenes*-specific PCR assay and "negative" would therefore be the correct and expected result in this case. 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. Again, when the use of *L. monocytogenes*-specific PCR assays was indicated, we have not scored (false) negative results for the latter sample 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 evaluate the analytical specificity of the MRSA-specific test systems, the current set contained a typical MRSA isolate, a mixture of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and *S. aureus*, as well as an "atypical" methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* (MSSA) strain containing a SCC*mec* cassette without a functional *mecA* gene (a so called ***mecA* dropout variant**). Sample # 1025391 of the current set contained a mixture of typical MRSA organisms (MRSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) and a CoNS strain (*mecA*-negative, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). With the exception of 14 participants, who reported false-negative results, and 6 participants, who reported "questionable" results, this sample was tested positive with the MRSA-specific NAT assays by 169 of the 189 participating laboratories. Five of the 6 participants who reported "questionable" for sample # 1025391 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene (where "questionable" is the expected and correct classification for this mixed sample). However, the 14 participants who have reported a negative MRSA result for sample # 1025391 should take immediate efforts to check and improve the analytical sensitivity and/or specificity of their NAT assay concepts.

Sample # 1025392 contained a mixture of an "atypical" methicillin-susceptible *S. aureus* isolate (MSSA, PVL-negative, $\sim 1 \times 10^4$ CFU/ml, SCC*mec*-positive but with a missing or nonfunctional *mecA* gene: a so-called "*mecA* dropout" variant) together with a CoNS strain (*mecA*-negative, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Correct (negative) results were only reported by 51 of the 189 participating laboratories. The poor performance of many commercial or *in-house* assays is not surprising - presumably due to the presence of a SCC*mec* cassette, the organism in sample # 1025392 of the

current set of QC samples was tested positive by a number of *in-house* PCR assays and by all of the commercial *SCCmec*-based assay concepts applied by the participants. As you may remember, an exotic MRSA strain without a common type of *SCCmec* cassettes (the so called "Zurich drug clone") was included in the last distribution to make participants aware of MRSA strains not easily picked up by targeting the *SCCmec-S. aureus* orfX region. Including a *S. aureus* strain with a *SCCmec* cassette but without a functional *mecA* gene had also some kind of educational background - just to make participants aware that the correct detection of an integrated *SCCmec* cassette is not necessarily linked with the presence of a functional *mecA* gene, leading to the expression of PBP2a and, as a consequence, to oxacillin-resistance on phenotypical level.

The statistical analyses are depicted in tables 3 and 4. Since this MSSA strain (*mecA* dropout variant) is certainly not listed among the most prevalent epidemiologic *S. aureus* isolates in Europe, we have not scored a negative result for the latter sample in the course of issuing the official QC certificates. However, backup samples of the corresponding ring trial set are available from the ring trial coordinator Dr. U. Reischl upon request.

Sample # 1025393 of the current set contained a mixture of typical CA-MRSA organisms (cMRSA, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) and a CoNS strain (*mecA*-negative, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). With the exception of 6 participants, who reported "questionable" results, this sample was tested positive by the MRSA-specific NAT assays of 183 participating laboratories. Again, 5 of the participants who reported "questionable" results for sample # 1025393 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene (where "questionable" is the expected and correct classification for this mixed sample).

The last sample of the current set (# 1025394) contained no target organisms but only a methicillin-susceptible CoNS strain (*mecA*-negative, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). For this sample, negative results were reported by all of the participants. The absence of false-positive results 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 issue with the MSSA strain in sample # 1025392, 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 on samples # 1025391, # 1025393 and # 1025394. Molecular detection of the *lukF/S-PV* gene was performed by 54 of the 189 participating laboratories and, with the exception of two results, all laboratories correctly classified the MRSA strain in samples #1025393 as PVL-positive.

RV 540: *Chlamydia (Chlamydophila) 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.

To assess the analytical sensitivity of the NAT-assays used by the individual participating laboratories, the current set of QC samples contained three samples positive for *C. pneumoniae* in a kind of dilution series. Sample # 1025402 was spiked with a relatively high number of *C. pneumoniae* target organisms ($\sim 5 \times 10^5$ IFU/ml) whereas sample # 1025401 contained an approximately tenfold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^4$ IFU/ml) and sample # 1025404 contained an approximately hundredfold lower number of *C. pneumoniae* ($\sim 5 \times 10^3$ IFU/ml). Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1025403. As depicted in table 2, only 2 false-negative results were observed for the strongly positive sample # 1025402 (5×10^5 IFU/ml), 6 false-negative results were observed for the tenfold weaker positive sample # 1025401 (5×10^4 IFU/ml), and 4 false-negative results as well as

one "questionable" result were observed for the very weak positive sample # 1025404 (5×10^3 IFU/ml). Since no false-positive results were observed for the "negative" sample # 1025403, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. It should be mentioned that all of the 9 participants, who indicated the use of the TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae*, obtained correct results for all samples of the current distribution. Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

RV 541: *Mycoplasma pneumoniae*

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

The current set of QC samples contained only one positive sample with a very high amount of *M. pneumoniae* target organisms (# 1025412; $\sim 5 \times 10^6$ genome copies/mL). Sample # 1025411 and sample # 1025413 were designed to monitor the analytical specificity of the assays currently used by the participating laboratories: these two samples contained a considerable amount of *M. genitalium* ($\sim 1 \times 10^6$ and $\sim 1 \times 10^5$ genome copies/mL, respectively) as a related species to the target organism. The set was completed by sample # 1025414, 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 *Mycoplasma pneumoniae*-specific results reported by the 86 participants for sample # 1025412, only correct results and no false-negatives were observed. Since only two false-positive results were observed for the "negative" sample # 1025414, it seems that the participating laboratories have implemented functional and efficient precautions to prevent deleterious contamination events. The remaining two samples # 1025411 and # 1025413 contained significant amounts of *M. genitalium* as a related species to the target organism - they were tested negative by 76 and 77 of the 86 participants, respectively. False-positive results for the latter samples are presumably due to intralaboratory cross-contamination events and/or analytical specificity issues with the corresponding PCR/NAT-based assays. At least for the 83 participants, who have submitted correct results for the *M. pneumoniae*-positive sample # 1025412 and for negative sample # 1025414, we have not scored a (false) positive result for the *M. genitalium* samples in the course of issuing the corresponding QC certificates. However, colleagues who observed such a cross-reaction with their *in-house* assays and are aiming at a high analytical performance should consider to improve the sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. It should further be mentioned that all of the 35 participants, who indicated the use of the following commercial *M. pneumoniae*-specific PCR/NAT assays, obtained correct results for all samples of the current distribution: "commercial assay / kit" (18 participants), Qiagen *M. pneumoniae* LC PCR Kit (7 participants), TIB Molbiol LightMix *M. pneumoniae* (5 participants), and Minerva Venor Mp (5 participants).

**RV 542: *Coxiella burnetii* and RV 543: *Francisella tularensis*
will start in April 2011 !**

**PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO
 (RV 530) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|--|
| 1025301 | ∅ / ∅ | 64 | <i>Neisseria sicca</i> |
| 1025302 | + / + | 62 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL) |
| 1025303 | ∅ / ∅ | 64 | <i>Neisseria lactamica</i> |
| 1025304 | + / ++ | 62 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) & <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |

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

| n = 128 | Probennummer (Sample no.) | | | | Inhibition | | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------|---------|---------|------------|---------|---------|---------|-----|
| | 1025301 | 1025302 | 1025303 | 1025304 | 1025301 | 1025302 | 1025303 | 1025304 | |
| Befund Result | | | | | | | | | |
| Positiv CT | 0 | 6 | 0 | 2 | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Positiv CT & GO | 0 | 120 | 1 | 118 | nein / no | 128 | 128 | 127 | 128 |
| Positiv GO | 1 | 0 | 9 | 4 | ja / yes | 0 | 0 | 1 | 0 |
| Negativ | 127 | 2 | 116 | 3 | | | | | |
| Fraglich / questionable | 0 | 0 | 2 | 1 | | | | | |

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

| NAT-Methode [Code] (total number *) | NAT richtig positiv True positive results | | | NAT richtig negativ True negative results | | |
|--|--|---------------------|-----|--|---------------------|-----|
| | Absolut Absolute | Relativ Relative | % | Absolut Absolute | Relativ Relative | % |
| GenProbe CT/NG [20] (n = 4) | 4 | 4 / 8 | 50 | 8 | 8 / 8 | 100 |
| LightMix CT/NG [21] (n = 7) | 14 | 14 / 14 | 100 | 14 | 14 / 14 | 100 |
| Roche Cobas TaqMan [22] (n = 18) | 33 | 33 / 36 | 92 | 36 | 36 / 36 | 100 |
| COBAS Amplicor [23] (n = 20) | 40 | 40 / 40 | 100 | 39 | 39 / 40 | 98 |
| BD ProbeTec [24] (n = 19) | 37 | 37 / 38 | 97 | 36 | 36 / 38 | 95 |
| Artus CT [25] (n = 5) | 10 | 10 / 10 | 100 | 10 | 10 / 10 | 100 |
| Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 28) | 55 | 55 / 56 | 98 | 56 | 56 / 56 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 25) | 48 | 48 / 49 § | 98 | 45 | 45 / 48 § | 94 |

| | | | | | | |
|---|-----------|---------|-----------|-----------|---------|-----------|
| In house PCR assay [28] (n = 20) | 34 | 34 / 40 | 85 | 35 | 35 / 40 | 88 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 4) | 7 | 7 / 8 | 88 | 7 | 7 / 8 | 88 |

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 = 4) | 5 | 5 / 8 | 63 | 8 | 8 / 8 | 100 |
| LightMix CT/NG [21] (n = 7) | 14 | 14 / 14 | 100 | 14 | 14 / 14 | 100 |
| Roche Cobas TaqMan [22] (n = 18) | 35 | 35 / 36 | 97 | 36 | 36 / 36 | 100 |
| COBAS Amplicor [23] (n = 20) | 40 | 40 / 40 | 100 | 39 | 39 / 39 § | 100 |
| BD ProbeTec [24] (n = 19) | 37 | 37 / 38 | 97 | 38 | 38 / 38 | 100 |
| Artus CT [25] (n = 5) | 10 | 10 / 10 | 100 | 10 | 10 / 10 | 100 |
| Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 28) | 56 | 56 / 56 | 100 | 56 | 56 / 56 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 25) | 48 | 48 / 49 § | 98 | 49 | 49 / 49 § | 100 |
| In house PCR assay [28] (n = 20) | 37 | 37 / 40 | 93 | 38 | 38 / 39 § | 97 |
| 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.

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.

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

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 = 4) | 6 | 6 / 8 | 75 | 8 | 8 / 8 | 100 |
| LightMix CT/NG [21] (n = 7) | 14 | 14 / 14 | 100 | 14 | 14 / 14 | 100 |
| Roche Cobas TaqMan [22] (n = 18) | 34 | 34 / 36 | 94 | 36 | 36 / 36 | 100 |
| COBAS Amplicor [23] (n = 20) | 40 | 40 / 40 | 100 | 39 | 39 / 40 | 98 |
| BD ProbeTec [24] (n = 19) | 38 | 38 / 38 | 100 | 36 | 36 / 38 | 95 |
| Artus CT [25] (n = 5) | 10 | 10 / 10 | 100 | 10 | 10 / 10 | 100 |
| Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 28) | 55 | 55 / 56 | 98 | 56 | 56 / 56 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 25) | 50 | 50 / 50 | 100 | 46 | 46 / 49 [§] | 94 |
| In house PCR assay [28] (n = 20) | 34 | 34 / 40 | 85 | 35 | 35 / 40 | 88 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 4) | 7 | 7 / 8 | 88 | 7 | 7 / 8 | 88 |

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

Tabelle 6: Falsch-positive und falsch-negative NAT-Befunde nach Methode

False-positive and -negative NAT results with commercial or in-house assays

| NAT-Methode NAT method | Positive samples | | Negative samples | |
|---------------------------------|----------------------|----------------------|------------------|----------|
| | 1025302 | 1025304 | 1025301 | 1025303 |
| GenProbe CT/NG (n = 4) | 2/4 GO- 1/4 CT- | 2/4 CT- | - | - |
| LightMix CT/NG (n = 7) | - | - | - | - |
| Roche Cobas TaqMan (n = 18) | 1/18 GO- | 2/18 GO- 1/18 CT- | - | - |
| COBAS Amplicor (n = 20) | - | - | - | 1/20 GO+ |
| BD ProbeTec (n = 19) | - | 1/19 CT- | - | 2/19 GO+ |
| Artus CT (n = 5) | - | - | - | - |
| Abbott RealTime CT/NG (n = 28) | 1/28 GO- | - | - | - |
| Other commercial tests (n = 25) | - | - | - | 3/25 GO+ |
| In house PCR assay (n = 20) | 3/20 GO- 1/20 CT- | 3/20 GO- 2/20 CT- | 1/20 GO+ | 4/20 GO+ |
| Andere / k.A. / other (n = 4) | 1/4 GO- | - | - | - |

**PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*
 (RV 531) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|---|
| 1025311 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025312 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025313 | + | 61 | <i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 ³ IFU/mL) |
| 1025314 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |

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

| n = 115 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025311 | 1025312 | 1025313 | 1025314 | | 1025311 | 1025312 | 1025313 | 1025314 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 1 | 2 | 113 | 0 | n.d. | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Negativ | 114 | 113 | 2 | 115 | nein <i>no</i> | 114 | 114 | 114 | 114 |
| 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> | % |
| GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 20) | 20 | 20 / 20 | 100 | 59 | 59 / 60 | 98 |
| Roche COBAS TaqMan [22] (n = 34) | 34 | 34 / 34 | 100 | 102 | 102 / 102 | 100 |
| COBAS Amplicor [23] (n = 3) | 3 | 3 / 3 | 100 | 9 | 9 / 9 | 100 |
| BD ProbeTec [24] (n = 16) | 15 | 15 / 16 | 94 | 48 | 48 / 48 | 100 |
| Artus CT [25] (n = 8) | 8 | 8 / 8 | 100 | 24 | 24 / 24 | 100 |
| Abbott CT/NG [26] (n = 6) | 6 | 6 / 6 | 100 | 18 | 18 / 18 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 11) | 11 | 11 / 11 | 100 | 31 | 31 / 33 | 94 |
| <i>In house</i> PCR assay [28] (n = 12) | 11 | 11 / 12 | 92 | 36 | 35 / 36 | 100 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 5) | 5 | 5 / 5 | 100 | 15 | 15 / 15 | 100 |

PCR-/NAT *Bordetella pertussis*
(RV 532) November 2010



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|---|
| 1025321 | ∅ | 62 | <i>Bordetella bronchiseptica</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL) |
| 1025322 | ++ | 61 | <i>Bordetella pertussis</i> ATCC 12742 (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |
| 1025323 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025324 | ∅ | 62 | <i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |

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

| n = 103 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025321 | 1025322 | 1025323 | 1025324 | | 1025321 | 1025322 | 1025323 | 1025324 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 4 | 100 | 0 | 10 | n.d. | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Negativ | 99 | 3 | 102 | 93 | nein <i>no</i> | 101 | 101 | 102 | 102 |
| 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> | % |
| Roche LightCycler Kit [20] (n = 1) | 1 | 1 / 1 | 100 | 3 | 3 / 3 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 32) | 32 | 32 / 32 | 100 | 87 | 87 / 96 | 91 |
| In house PCR assay [28] (n = 68) | 65 | 65 / 68 | 96 | 198 | 198 / 203 § | 98 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 2) | 2 | 2 / 2 | 100 | 6 | 6 / 6 | 100 |

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

Comments: ¹⁾ Ten of the 103 participants reported a false-positive result for sample # 1025324 (*B.parapertussis*). This could be due to a "simple" cross-contamination event and/or a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*B.pertussis*-specific" PCR assays.

PCR-/NAT *Helicobacter pylori*
(RV 533) November 2010



Tabelle 1: Probenzusammensetzung und erwartetes Ergebnis.

Sample composition and expected results.

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|-------|--|
| 1025331 | +++ | 61/72 | <i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 28S rDNA sequence) |
| 1025332 | ++ | 61/71 | <i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA & GTA mut. in 28S rDNA) |
| 1025333 | ∅ | 62 | <i>Helicobacter mustelae</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL) |
| 1025334 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |

Tabelle 2: Häufigkeit der Mitteilung verschiedener Befunde.

Absolute numbers of reported individual results.

| n = 35 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|------------------|---------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025331 | 1025332 | 1025333 | 1025334 | | 1025331 | 1025332 | 1025333 | 1025334 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 35 ¹⁾ | 34 ¹⁾ | 1 | 0 | n.d. | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Negativ | 0 | 1 | 34 | 35 | nein <i>no</i> | 34 | 34 | 34 | 34 |
| 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> | % |
| Commercial assay [27] (n = 9) | 17 | 17 / 18 | 94 | 18 | 18 / 18 | 100 |
| In house PCR assay [28] (n = 24) | 48 | 48 / 48 | 100 | 47 | 47 / 48 | 98 |
| 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.

Comments: ¹⁾ Twentyfour of the 35 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing.
 All reported results were correct.

**PCR-/NAT EHEC / STEC
 (RV 534) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|------------------|--|
| 1025341 | +++ | 61 / 71,73,77,78 | EHEC (~1x10 ⁵ CFU/mL) (<i>stx-1, stx-2c, eae, hlyA</i>) |
| 1025342 | ++ | 61 / 71,73,77,78 | EHEC (~1x10 ⁴ CFU/mL) (<i>stx-1, stx-2c, eae, hlyA</i>) |
| 1025343 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i>) |
| 1025344 | + | 61 / 71,73,77,78 | EHEC (~1x10 ³ CFU/mL) (<i>stx-1, stx-2c, eae, hlyA</i>) |

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

| n = 69 | Probennummer (Sample no.) | | | | Inhibition | | | | |
|--|---------------------------|------------------|---------|------------------|-------------------|---------|---------|---------|----|
| | 1025341 | 1025342 | 1025343 | 1025344 | 1025341 | 1025342 | 1025343 | 1025344 | |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 68 ¹⁾ | 66 ¹⁾ | 1 | 55 ¹⁾ | n.d. | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Negativ | 1 | 3 | 68 | 11 ²⁾ | nein <i>no</i> | 67 | 67 | 67 | 67 |
| Fraglich <i>Questionable</i> | 0 | 0 | 0 | 3 | 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 = 16) | 42 | 42 / 48 | 88 | 16 | 16 / 16 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 5) | 15 | 15 / 15 | 100 | 5 | 5 / 5 | 100 |
| In house PCR assay [28] (n = 47) | 130 | 130 / 139 [§] | 94 | 46 | 46 / 47 | 98 |
| Andere/ k.A. / other [29] (n = 1) | 2 | 2 / 2 [§] | 100 | 1 | 1 / 1 | 100 |

[§] 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 63 laboratories.
 2) Eleven of the 69 participants reported negative results for sample # 1025344. Due to the low number of target organisms we have not rated them as "false-negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 535) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|---|
| 1025351 | + | 61 | <i>Borrelia bavariensis</i> , PBI (~ 1x10 ⁴ organisms/mL) |
| 1025352 | +++ | 61 | <i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> , PK2 (~ 1x10 ⁶ organisms/mL) |
| 1025353 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025354 | ∅ | 62 | <i>Borrelia miyamotoi</i> |

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

| n = 99 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|------------------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025351 | 1025352 | 1025353 | 1025354 | | 1025351 | 1025352 | 1025353 | 1025354 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 96 | 98 | 0 | 12 ¹⁾ | n.d. | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Negativ | 3 | 1 | 99 | 85 | nein <i>no</i> | 97 | 97 | 97 | 96 |
| Fraglich <i>Questionable</i> | 0 | 0 | 0 | 2 | ja <i>yes</i> | 0 | 0 | 0 | 1 |

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> | % |
| RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 14) | 28 | 28 / 28 | 100 | 26 | 26 / 27 [§] | 96 |
| Demeditec GenFlow [21] (n = 10) | 20 | 20 / 20 | 100 | 20 | 20 / 20 | 100 |
| Other/commercial tests [27] (n = 13) | 26 | 26 / 26 | 100 | 24 | 24 / 26 | 92 |
| <i>In house</i> PCR assay [28] (n = 61) | 118 | 118 / 122 | 97 | 112 | 112 / 121 [§] | 93 |
| 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.

Comments:¹⁾ Twelve of the 99 participants reported positive results for sample # 1025354. This could be due to a "simple" cross-contamination event and/or a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*B.burgdorferi*-specific" PCR assays - see Discussion for more details.

**PCR-/NAT *Legionella pneumophila*
 (RV 536) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|--|
| 1025361 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025362 | ∅ | 62 | <i>Legionella bozemanii</i> (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) |
| 1025363 | ∅ | 62 | <i>Legionella bozemanii</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |
| 1025364 | ++ | 61 | <i>Legionella pneumophila</i> SG1 (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) |

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

| n = 64 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|------------------|-----------------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025361 | 1025362 | 1025363 | 1025364 | | 1025361 | 1025362 | 1025363 | 1025364 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 0 | 10 ¹⁾ | 6 ¹⁾ | 61 | n.d. | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Negativ | 64 | 53 | 57 | 3 | nein <i>no</i> | 63 | 63 | 63 | 63 |
| 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> | % |
| BD ProbeTec Legionella [26] (n = 1) | 1 | 1 / 1 | 100 | 3 | 3 / 3 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 19) | 18 | 18 / 19 | 95 | 56 | 56 / 57 | 98 |
| In house PCR assay [28] (n = 43) | 41 | 41 / 43 [§] | 87 | 112 | 112 / 127 [§] | 88 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 2) | 2 | 2 / 2 | 100 | 6 | 6 / 6 | 100 |

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

Comments: ¹⁾ Ten and six of the 64 participants reported false-positive results for sample # 1025362 and # 1025363 respectively. This could be due to a "simple" cross-contamination event and/or a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*Legionella pneumophila* - specific" in-house PCR assays.

**PCR-/NAT *Salmonella enterica*
 (RV 537) November 2010**



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

| Gruppe A | <i>Erwartet / expected</i> | | <i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i> |
|----------|----------------------------|----|--|
| 1025371 | +++ | 61 | <i>S. enterica</i> ser. Typhi (~ 1x10 ⁶ CFU/mL) |
| 1025372 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025373 | + | 61 | <i>S. enterica</i> ser. Typhi (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |
| 1025374 | ++ | 61 | <i>S. enterica</i> ser. Typhi (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) |

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

| <i>n</i> = 5 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025371 | 1025372 | 1025373 | 1025374 | | 1025371 | 1025372 | 1025373 | 1025374 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 5 | 0 | 5 | 4 | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Negativ | 0 | 5 | 0 | 1 | nein <i>no</i> | 5 | 5 | 5 | 5 |
| 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) | 3 | 3 / 3 | 100 | 1 | 1 / 1 | 100 |
| <i>In house</i> PCR assay [28] (n = 4) | 11 | 11 / 12 | 92 | 4 | 4 / 4 | 100 |

**PCR-/NAT *Listeria spp.*
 (RV 538) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|--------|--|
| 1025381 | + | 61 /71 | <i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 ³ CFU/mL) |
| 1025382 | ++ | 61 /74 | <i>Listeria innocua</i> (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |
| 1025383 | (+) | 61 /71 | <i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 ² CFU/mL) |
| 1025384 | Ø | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |

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

| n = 24 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|------------------|-----------------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025381 | 1025382 | 1025383 | 1025384 | | 1025381 | 1025382 | 1025383 | 1025384 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 23 | 2 | 18 | 0 | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Negativ | 1 | 22 ¹⁾ | 6 ²⁾ | 24 | nein <i>no</i> | 24 | 24 | 24 | 24 |
| 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) | 6 | 6 / 9 | 67 | 3 | 3 / 3 | 100 |
| In house PCR assay [28] (n = 21) | 37 | 37 / 63 | 59 | 21 | 21 / 21 | 100 |

Comments: ¹⁾ Due to the predominant use of *L.monocytogenes*-specific PCR assays, negative PCR results with sample # 1025382 are not rated as "false negative".

²⁾ As sample # 1025383 contained a very low number of *L. monocytogenes* 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 MRSA / cMRSA
 (RV 539) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|-----------------|--|
| 1025391 | ++ | 61 / 72, 76 | MRSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , CoNS, oxa ^R , PVL-neg) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) |
| 1025392 | Ø/++ | 62 / 72, 76 | MSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , CoNS, oxa ^S) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) " mecA dropout mutant " |
| 1025393 | ++ | 61 / 71, 72, 76 | cMRSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , CoNS, oxa ^R , PVL-pos) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL) |
| 1025394 | Ø | 62 / 76 | CoNS (oxa ^S) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL) |

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

| n = 189 | Probennummer (Sample no.) | | | | Inhibition | | | | |
|--|---------------------------|-------------------|-------------------|---------|------------|---------|---------|---------|-----|
| | 1025391 | 1025392 | 1025393 | 1025394 | 1025391 | 1025392 | 1025393 | 1025394 | |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 169 ¹⁾ | 136 ²⁾ | 183 ¹⁾ | 0 | n.d. | 2 | 2 | 2 | 2 |
| Negativ | 14 | 51 ³⁾ | 0 | 189 | nein no | 187 | 187 | 187 | 187 |
| Fraglich <i>Questionable</i> | 6 ²⁾ | 2 | 6 ²⁾ | 0 | ja yes | 0 | 0 | 0 | 0 |

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

| NAT-Methode [Code] (total number *) | NAT richtig positiv <i>True positive results</i> | | | NAT richtig negativ <i>True negative results</i> | | |
|---|---|----------------------------|-----|---|----------------------------|-----|
| | Absolut <i>Absolute</i> | Relativ <i>Relative</i> | % | Absolut <i>Absolute</i> | Relativ <i>Relative</i> | % |
| BD GeneOhm MRSA [20] (n=39) | 78 | 78 / 78 | 100 | 44 | 44 / 78 | 56 |
| GenoType MRSA Direct [21] (n=40) | 78 | 78 / 78 [§] | 100 | 46 | 46 / 79 [§] | 58 |
| Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=5) | 4 | 4 / 4 [§] | 100 | 10 | 10 / 10 | 100 |
| LightCycler Kits [23] (n=2) | 3 | 3 / 4 | 75 | 4 | 4 / 4 | 100 |
| GeneXpert (Cepheid) [24] (n=45) | 90 | 90 / 90 | 100 | 55 | 55 / 90 | 61 |
| LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=20) | 36 | 36 / 40 | 90 | 22 | 22 / 40 | 55 |
| Commercial assay kit [27] (n=9) | 15 | 15 / 16 [§] | 94 | 15 | 15 / 18 | 83 |
| <i>In house</i> PCR assay [28] (n=34) | 59 | 59 / 66 [§] | 89 | 54 | 54 / 67 [§] | 81 |
| Andere / k.A. / other [29] (n=9) | 17 | 17 / 18 | 94 | 13 | 13 / 18 | 72 |

* 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 54 laboratories. With the exception of 2 laboratories, all reported results were correct.
 - ²⁾ Bei Teilnehmern, die die Verwendung eines Testsystems aufgeführt haben, das auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruht, wurden die als "fraglich" klassifizierten Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate als "richtig" bewertet.
For participants who indicated the use of assay concepts for the independent detection of the mecA gene and a S. aureus species marker gene, "questionable" results were accepted in the course of issuing the official QC certificates.
 - ³⁾ Bei Teilnehmern, die die Verwendung eines SCCmec-gestützten Testsystems aufgeführt haben, wurden die als "positiv" klassifizierten Ergebnisse bei der Erteilung der Zertifikate als zumindest "technisch richtig" bewertet.
For participants who indicated the use of SCCmec-based assay concepts, "positive" results were considered as "technically correct" and accepted in the course of issuing the official QC certificates.

**PCR-/NAT *Chlamydia pneumoniae*
 (RV 540) November 2010**



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

| Gruppe A | <i>Erwartet / expected</i> | | Probenzusammensetzung / <i>Sample composition</i> |
|----------|----------------------------|----|--|
| 1025401 | ++ | 61 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 5x10 ⁴ IFU/mL) |
| 1025402 | +++ | 61 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 5x10 ⁵ IFU/mL) |
| 1025403 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |
| 1025404 | (+) | 61 | <i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 5x10 ³ IFU/mL) |

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

| <i>n</i> = 78 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025401 | 1025402 | 1025403 | 1025404 | | 1025401 | 1025402 | 1025403 | 1025404 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 72 | 76 | 0 | 73 | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Negativ | 6 | 2 | 77 | 4 | nein <i>no</i> | 78 | 78 | 77 | 77 |
| Fraglich <i>Questionable</i> | 0 | 0 | 1 | 1 | ja <i>yes</i> | 0 | 0 | 1 | 1 |

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

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

| NAT-Methode [Code] (total number *) | NAT richtig positiv <i>True positive results</i> | | | NAT richtig negativ <i>True negative results</i> | | |
|--|---|----------------------------|-----|---|----------------------------|-----|
| | Absolut <i>Absolute</i> | Relativ <i>Relative</i> | % | Absolut <i>Absolute</i> | Relativ <i>Relative</i> | % |
| LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n =9) | 27 | 27 / 27 | 100 | 9 | 9 / 9 | 100 |
| Other commercial tests [27] (n = 22) | 63 | 63 / 66 | 95 | 22 | 22 / 22 | 100 |
| In house PCR assay [28] (n = 45) | 125 | 125 / 134 § | 93 | 44 | 44 / 44 § | 100 |
| Andere / k.A. / other [29] (n =2) | 6 | 6 / 6 | 100 | 2 | 2 / 2 | 100 |

**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae*
 (RV 541) November 2010**



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

| Gruppe A | Erwartet / expected | | Probenzusammensetzung / Sample composition |
|----------|---------------------|----|--|
| 1025411 | ∅ | 62 | <i>Mycoplasma genitalium</i> (~ 10 ⁶ genome copies/mL) |
| 1025412 | +++ | 61 | <i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 5 x 10 ⁶ genome copies/mL) |
| 1025413 | ∅ | 62 | <i>Mycoplasma genitalium</i> (~ 10 ⁵ genome copies/mL) |
| 1025414 | ∅ | 62 | <i>Escherichia coli</i> K12 |

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

| n = 86 | Probennummer (Sample no.) | | | | | Inhibition | | | |
|--|---------------------------|---------|---------|---------|-------------------|------------|---------|---------|---------|
| | 1025411 | 1025412 | 1025413 | 1025414 | | 1025411 | 1025412 | 1025413 | 1025414 |
| Befund <i>Result</i> | | | | | | | | | |
| Positiv | 9 | 86 | 8 | 2 | n.d. | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Negativ | 76 | 0 | 77 | 83 | nein <i>no</i> | 86 | 86 | 85 | 85 |
| Fraglich <i>Questionable</i> | 1 | 0 | 1 | 1 | ja <i>yes</i> | 0 | 0 | 1 | 1 |

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 =5) | 5 | 5 / 5 | 100 | 15 | 15 / 15 | 100 |
| Qiagen <i>M.pneumoniae</i> [21] (n = 7) | 7 | 7 / 7 | 100 | 21 | 21 / 21 | 100 |
| Minerva Venor Mp [22] (n = 5) | 5 | 5 / 5 | 100 | 15 | 15 / 15 | 100 |
| Commercial assay / kit [27] (n = 18) | 17 | 17 / 17 § | 100 | 51 | 51 / 52 § | 98 |
| <i>In house</i> PCR assay [28] (n =49) | 49 | 49 / 49 | 100 | 134 | 134 / 147 | 91 |
| Andere / k.A. / other [29] (n = 2) | 2 | 2 / 2 | 100 | 2 | 2 / 6 | 33 |

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