



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



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



WHO Collaborating Centre for Quality Assurance  
and Standardization in Laboratory Medicine

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

**IN STAND-Geschäftsstelle**

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

**Ringversuchsleiter:**

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



Regensburg, den 5. Dezember 2012

## **RINGVERSUCHSAUSWERTUNG - November 2012**

### **An die Teilnehmer**

### **der IN STAND e.V. -Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT**

(IN STAND-Ringversuchsnummern 530 bis 543 sowie 560)

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 21-29 of this document. As always, result tables are depicted in a bilingual style.*

### **Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,**

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

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

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

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

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**Prof. Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle,  
Dr. U. Busch, Dr. D. Frangoulidis, PD Dr. W. Splettstösser, PD Dr. G. Grass, Dr. I. Reiter-Owona**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 15 unterschiedliche bakterielle und fungale Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder gewisse „highlights“: so wurden beispielsweise in zwei der 4 Einzelproben des **RV 531** sehr geringe Mengen an *Chlamydia trachomatis* Zielorganismen ( $1 \times 10^3$  IFU / mL) versandt und mit den Testsystemen nahezu aller Teilnehmer erfolgreich detektiert. Als weiteres "highlight" innerhalb der aktuellen Ringversuchsrunde wurde in einer der 4 Einzelproben des **RV 539** ein sog. **mecA-dropout MSSA Isolat** (Oxacillin-empfindlicher *Staphylococcus aureus* mit SCCmec Kasette, die aber kein funktionelles *mecA* Gen enthielt) ausgesandt.

Angesichts der beiden Milzbrandfälle bei Heroinkonsumenten aus dem Raum Regensburg, die wir in unserem Institut, sozusagen "unmittelbar vor Ort", sowohl kulturell isoliert, mittels real-time PCR identifiziert und in enger Zusammenarbeit mit dem Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) und dem RKI (Berlin) auch molekular feintypisieren konnten, wird der Ringversuch **RV 542** (Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii*) ab Mai 2013 um den Zielorganismus *Bacillus anthracis* erweitert. Er wird im Ringversuchsprogramm zukünftig als kombinierter PCR/NAT-Ringversuch „**RV 542** Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii* / *B. anthracis*“ geführt. Aufgrund des großen Interesses an geeigneten PCR-Protokollen und der Verfügbarkeit von entsprechendem Positivkontrollmaterial nach unseren entsprechenden Fallberichten (u.a. [http://www.dghm.org/m\\_323](http://www.dghm.org/m_323), Deutsches Ärzteblatt; *in press*) haben wir uns entschlossen, diesen kombinierten Ringversuch RV 542 als speziellen Service für die im L3-Bereich tätigen Kolleginnen und Kollegen ohne Mehrkosten anzubieten. Bei der fachlichen Betreuung werden wir dankenswerterweise durch Herrn Kollegen PD Dr. Gregor Grass vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr (München) unterstützt.

Und hier gleich noch eine Mitteilung zur Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms PCR/NAT: nach erfolgreicher Durchführung des Proberingversuchs wird ab der kommenden Ringversuchsrunde im Mai 2013 auch der **RV 560** zum PCR/NAT-gestützten Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenom-Nachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen. An der Ringversuchsleitung wird hier meine Kollegin Frau Dr. Ingrid Reiter-Owona, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Immunologie und Parasitologie (IMMIP), Bonn, maßgeblich beteiligt sein.

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

### NOVEMBER 2012:

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum "Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)" bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1225303 und # 1225304), sowie die positive Proben des RV 531 # 1225311, und 1225312), *Neisseria gonorrhoeae* (Proben # 1225302 und # 1225304), *Bordetella pertussis* (Probe # 1225324), *Salmonella enterica* (Probe # 1225372), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 1225401), *Coxiella burnetii* (Probe # 1225424), sowie *Pneumocystis jirovecii* (Probe # 1225603). 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. Die aktuellen Rückstellprobensätze des RV 544 (*Pneumocystis jirovecii*) sind leider bereits vergriffen.

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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

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

Die Ergebnislage des aktuellen Ringversuchs deckt sich, mit Ausnahme eines interessanten Einzelaspekts, weitgehend mit den Beobachtungen aus vorangegangenen Ringversuchen zum kombinierten NAT-gestützten *C. trachomatis* und Gonokokken-Nachweis. Trotz der relativ geringen Erregermenge in den drei unterschiedlich zusammengesetzten positiven Proben führte auch diesmal die Verfügbarkeit gut evaluierter und zum Teil automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme für *Chlamydia trachomatis* zu hohen Richtigkeitsquoten sowohl für positive als auch für negative Befunde.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei Proben mit relativ geringen Menge an *C. trachomatis* (#1225303 und #1225304,  $\sim 1 \times 10^3$  IFU/mL und  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/mL), und zwei Proben (#1225302 und #1225304) mit ca.  $5 \times 10^3$  CFU/mL und  $1 \times 10^3$  CFU/mL an *N. gonorrhoeae*. Probe #1225301 enthielt lediglich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* als bakterielle Komponente.

Auch wenn die beiden positiven Proben #1225303 und #1225304 des aktuellen Ringversuchs diesmal nur mit einer relativ geringen Menge an *C. trachomatis* Zielorganismen versetzt worden waren, fanden sich unter den von insgesamt 137 Teilnehmern mitgeteilten NAT-Ergebnissen für *C. trachomatis* lediglich 5 falsch-negative Ergebnisse. Da von einem Großteil der Anwender mit den unterschiedlichsten Testsystemen durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet wurden, handelt es sich bei den falschen Ergebnissen vermutlich um Ringversuchstypische "sporadische Ausreißer".

Im Rahmen des NAT-gestützten Gonokokken-Nachweises wurden für die Probe #1225304 (*C. trachomatis* und *N. gonorrhoeae*; ca.  $5 \times 10^3$  IFU bzw. ca.  $1 \times 10^3$  CFU/mL) diesmal von 21 der insgesamt 137 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Gonokokken DNA mitgeteilt. In der anderen Probe (#1225302) befand sich mit  $5 \times 10^3$  CFU/mL zwar eine nur geringfügig höhere Menge an *N. gonorrhoeae* Zielorganismen - hier konnten jedoch (interessanterweise) nur 4 der insgesamt 137 Teilnehmer keine Gonokokken DNA nachweisen und es wurden lediglich 4 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Für diesen Effekt, der in ähnlicher Konstellation ja bereits im vorhergehenden Ringversuch vom Mai 2012 beobachtet wurde, hat der Ringversuchsleiter keine naheliegende Erklärung. Denkbar wäre natürlich eine gewisse Konkurrenzsituation der im Reaktionsgemisch der proprietären Testkits vorhandenen Primer-Moleküle. Zumindest aus wissenschaftlicher Sicht ist bei Chlamydien und Gonokokken aber davon auszugehen, daß die spezifische Amplifikation von Genomsegmenten dieser beiden unterschiedlichen Zielorganismen über unterschiedliche Primersets verläuft und seitens der Hersteller dafür keine Konsensus-Primersequenzen eingesetzt werden.

Angesichts der mit  $5 \times 10^3$  bzw.  $1 \times 10^3$  CFU/mL ehrlicherweise nicht als "äußerst gering" zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen in den Proben #1225302 und #1225304 sollten falsch-negative Ergebnisse bei betroffenen Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen Gonokokken-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben.

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

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

Ich glaube es ist auch für den Leser dieser Ringversuchsdiskussion weitgehend nachvollziehbar daß wir als Organisatoren von Testkonzept- und Testplattform-übergreifenden Ringversuchen bei der Konfektionierung unserer Probenmaterialien leider nicht jede Besonderheit im Abarbeitungsprotokoll von kommerziellen Testsystemen berücksichtigen oder unterschiedliche Arten von Ringversuchsprobenmaterial für bestimmte Testsysteme bereitstellen können. Auf diesen Umstand wurde bereits bei früheren Ringversuchen mehrfach im Zusammenhang mit den RNA-Zielsequenzen der AMPLIFIED CT Testkits oder der APTIMA COMBO 2 Testkits (Hersteller: Gen-Probe Inc.) hingewiesen. Werden von Teilnehmern bestimmte NAT-Testsysteme eingesetzt, die erregerspezifische RNA-Zielsequenzen nachweisen oder auf einem RNA-basierten Amplifikationsprozess (TMA; Transcription-Mediated Amplification, o.ä.) beruhen, so kann mit dem hier versandten Probenmaterial offiziell keine regelgerechte Abprüfung der entsprechenden

Sensitivitäten unter Routinebedingungen gewährleistet werden. Aber selbst wenn das Herstellungsverfahren unserer Ringversuchsproben primär nicht auf die Stabilisierung von RNA-Molekülen hin optimiert und getestet wurde, so konnten dennoch sowohl bei der aktuellen wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden von vielen Teilnehmern mit RNA-gestützten Testsystemen hohe Richtigkeitsquoten erzielt werden. Aktuell wurden zumindest die *C. trachomatis* Zielorganismen von allen 7 Teilnehmern mit RNA-basierten Gen-Probe Testsystemen erfolgreich nachgewiesen. Selbst der erfolgreiche Nachweis von Gonokokken RNA Zielsequenzen gelang 3 Teilnehmern. Dies deutet, zumindest indirekt, auf ausreichend hohen Mengen an erregerspezifischen RNA-Molekülen in dem konfektionierten und lyophilisierten Probenmaterial hin.

Entsprechende Inhibitionskontrollen wurden von allen 137 Teilnehmern durchgeführt, und Inhibitionsereignisse wurden diesmal nicht mitgeteilt.

Bei den ermittelten Richtigkeitsquoten für Teilnehmer mit dem Roche COBAS Amplicor, COBAS TaqMan, dem Becton Dickinson ProbeTec, Abbott RealTime CT/NG, Artus CT, LightMix CT/NG oder anderen Testsystemen muss berücksichtigt werden, daß im Rahmen dieser Ringversuchsauswertung in Tabelle 3 nicht zwischen dem spezifischen Nachweis von Chlamydien und Gonokokken differenziert wurde. Mit dem Großteil dieser kombinierten Testsysteme wurden insgesamt erfreulich hohe Richtigkeitsquoten sowohl für die positiven als auch für die negativen Ergebnisse beobachtet. Um eine detaillierter Bewertung der *C. trachomatis*- und GO-spezifischen NAT-Komponenten dieser kombinierten Testsysteme zu ermöglichen wurden diesmal zusätzlich die Tabellen 4 und 5 angefertigt. In Tabelle 4 sind dabei nur die *C. trachomatis* (CT)-spezifischen Ergebnisse und in Tabelle 5 nur die *Neisseria gonorrhoeae* (GO)-spezifischen Ergebnisse dargestellt und statistisch ausgewertet.

**Anmerkung:** Bevor durch einen kurzen Blick auf die prozentualen Richtigkeitsquoten in diesen Tabellen ein eventuell etwas zu voreiliger Rückschluss auf die diagnostische "Performance" bestimmter kommerzieller Testsysteme gezogen wird, sollten erst die effektiven Teilnehmerzahlen berücksichtigt werden, die den dargestellten Richtigkeitsquoten arithmetisch zugrunde liegen.

Im handschriftlichen Kommentarfeld der Ergebnisformulare wurden unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Roche Cobas 4800 System (15x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (4x), Mikrogen Diagenode *N. gonorrhoeae* Real Time PCR kit (4x), BD ProbeTec (4x), TIB Molbiol LightMix NG (3x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (2x), GeneProof *N. gonorrhoeae* PCR Kit (2x), Mikrogen Diagenode *C. trachomatis* Real Time PCR kit (2x), Amplex Hyplex STD (2x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (2x), GeneXpert CT/NG Assay von Cepheid (2x), *N. gonorrhoeae* Amplex Multiplex ELISA (1x), APTIMA Combo 2 Assay von Gen Probe (1x), Medac/Goffin CT/NG Assay (1x), AmpliSens *N. gonorrhoeae/C. trachomatis* MULTIPRIME-FRT PCR Kit (1x), Bioron RealLine *C. trachomatis/N. gonorrhoeae* (1x) und Seeplex STI Master Panel1 von Seegene (1x).

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

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

Das aktuelle Ringversuchssset enthielt diesmal zwei identische Proben mit relativ niedriger Menge an Zielorganismen (# 1225311, und # 1225312 mit  $10^3$  IFU/mL an *C. trachomatis*), sowie zwei Proben ohne Zielorganismen (# 1225313, und # 1225314), die ausschließlich nicht infizierte Zellen und *Escherichia coli* enthielten.

Wie Tabelle 2 der statistischen Auswertung zu entnehmen ist, wurden bei den beiden positiven Proben durchwegs korrekte Ergebnisse für Probe # 1225311 und lediglich von 3 der insgesamt 108 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für Probe # 1225312 mitgeteilt. Auch bei den negativen

Proben # 1225313 und # 1225314 wurden diesmal (bis auf ein isoliertes falsch-positives Ergebnis) erfreulicherweise durchwegs richtig negative Ergebnisse berichtet. Zudem befanden sich unter den insgesamt 432 mitgeteilten Ergebnissen auch keine als "fraglich" klassifizierten Befunde.

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

Auch wenn mit  $1 \times 10^3$  IFU/mL an Zielorganismen im Probenmaterial die untere Nachweisgrenze hochsensitiver und standardisierter PCR/NAT-gestützter Testsysteme erreicht zu sein scheint, sollten bei Ringversuchsteilnehmern mit hohem Anspruch an die individuelle Testsensitivität sowohl falsch-negative als auch falsch-positive Ergebnisse Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben. Angesichts der nach wie vor anhaltenden Diskussion um das "pooling" von entsprechendem Untersuchungsmaterial bleibt der Aspekt der analytischen Sensitivität der jeweils eingesetzten Testsysteme bedeutsam.

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

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. folgende Testsysteme aufgeführt: BD ProbeTec (2x), GeneXpert CT/NG Assay von Cepheid (2x), Autoimmun Diagnostika Gen ID STD Kit (1x), GeneProof *C. trachomatis* PCR Kit (1x), Roche Cobas 4800 System (1x), APTIMA Combo 2 Assay von Fa. Gen Probe (1x), HAIN Lifescience GenoQuick CT (1x), Onar CT von Minerva biolabs (1x) und Artus *Chlamydia trachomatis* (1x).

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt zwei positive Proben mit einer hohen und einer etwa 100-fach geringeren Menge an Zielorganismen (# 1225321 mit  $10^5$  CFU/mL und # 1225324 mit  $10^3$  CFU/mL an *B. pertussis*), sowie eine Probe mit einem klinischen Isolat von *Bordetella parapertussis* als verwandte Spezies (# 1225322 mit  $10^4$  CFU/mL). Probe # 1225323 enthielt diesmal keine Zielorganismen, sondern lediglich *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen.

Die Verfügbarkeit von offensichtlich inzwischen sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *Bordetella pertussis* DNA führte auch diesmal wieder zu durchwegs hohen Richtigkeitsquoten sowohl bei den positiven als auch bei den negativen Proben. Lediglich von einem der insgesamt 106 Teilnehmer wurde ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1225322 (*B. parapertussis*) mitgeteilt. Hierbei handelt es sich offensichtlich um laborinterne Kontaminationsereignisse oder um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung. Auch eine mangelnde Spezifität des eingesetzten PCR/NAT-Testsystems ist bei dieser Konstellation denkbar.

Unter den insgesamt 424 mitgeteilten NAT-Ergebnissen befanden sich zudem 11 falsch-negative und 3 als „fraglich“ klassifizierte Ergebnisse für die schwach positive Probe # 1225324 ( $10^3$  CFU/mL an *B. pertussis*).

Inhibitionskontrollen wurden von 104 der insgesamt 106 Teilnehmer durchgeführt und Inhibitionsergebnisse wurden dabei von keinem Teilnehmer beobachtet.

Bei einer Menge von  $10^3$  CFU/mL an *B. pertussis* Zielorganismen (entspricht ca.  $10^2$  CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessierten Probenvolumen von 100 µl) nähert man sich offensichtlich der unteren Nachweisgrenze entsprechender Testsysteme an. Aufgrund der

relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1225324 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.

Wie auch bei den vorhergegangenen Ringversuchen verwendete die überwiegende Anzahl der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis*. In diesem Zusammenhang wurde von 53 Teilnehmern explizit die Verwendung der Insertionssequenz IS481, von 9 Teilnehmern die Verwendung der Pertussis Toxin Gen und von 2 Teilnehmern die Verwendung eines ribosomalen Gens als *B. pertussis*-spezifische Zielsequenz angegeben.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix BP (11x), HAIN Lifescience GenoQuick Bordetella (7x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP *B. pertussis* (6x), AmpliGnost *B. pertussis/parapertussis* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (6x), Mikrogen Diagenode *B. pertussis* / *B. parapertussis* kit (5x), GeneProof *B. pertussis* / *parapertussis* PCR Kit (3x), *B. pertussis* / *B. parapertussis* von Cepheid (2x) und Attomol *Bordetella* DNA-LINA (1x).

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine positive Probe eines Clarithromycin-resistenten *H. pylori* (# 1225332;  $1 \times 10^5$  CFU/ml) und eine positive Probe eines Clarithromycin-sensiblen *H. pylori* (# 1225333;  $1 \times 10^5$  CFU/ml). Probe # 1225331 enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), und Probe # 1225334 ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysensysteme und die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den beiden stark positiven Proben # 1225332 und # 1225333 ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) führte beim Nachweis von *H. pylori* DNA zu insgesamt sehr hohen Richtigkeitsquoten.

Lediglich von einem der insgesamt 41 Teilnehmer wurde ein falsch-negatives Ergebnis für die positive Probe # 1225333 und von 7 weiteren Teilnehmern ein falsch-positives Ergebnis für die negative Probe # 1225331 mitgeteilt. Diese Probe enthielt eine Kultursuspension der Spezies *Helicobacter mustelae* in signifikanter Menge ( $\sim 1 \times 10^5$  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.

Falsch-positive Ergebnisse bei Probe #1225331 sollten bei den betroffenen Ringversuchsteilnehmern jedoch Anlaß zur Überprüfung und Optimierung der Speziespezifität ihres jeweiligen *Helicobacter pylori*-spezifischen NAT-gestützten Testsystems geben.

Bei der Probe # 1225334, die diesmal 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 18 Teilnehmer mit kommerziellen Testsystemen (im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" 11 x GenoType Helico Kit von HAIN Lifescience, 1 x AmpliSens *H.pylori* FRT PCR Kit, 1 x Diarella *Helicobacter* real time PCR Kit von Gerbion und 1 x *H. pylori* Real TM von Sacace angegeben) verwendeten die Teilnehmer zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte, sog. *in house* Testsysteme. Bei allen 43 Teilnehmern beinhalteten diese Testsysteme auch eine Inhibitionskontrolle, und von keinem der Teilnehmer wurden in den Einzelproben des Ringversuchs Inhibitionsergebnisse beobachtet.

Wie in der Testbeschreibung des RV 533 vermerkt, konnten die Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeintliche Clarithromycin-Resistenz der untersuchten *H. pylori* Isolate mitteilen. Diese Spezialuntersuchung zur molekularbiologischen Resistenztestung erfolgt in der Regel über die Amplifikation und Sequenzierung von charakteristischen Bereichen innerhalb der *H. pylori*

23S rDNA bzw. der Sequenzanalyse dieses Genombereichs mittels Hybridisierungssonden. Ergebnisse wurden hier von 29 der insgesamt 41 Teilnehmer mitgeteilt, und bis auf einen Ausnahme waren diese erfreulicherweise auch durchwegs korrekt.

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

Wie auch bereits bei den vorhergegangenen Runden dieses Ringversuchs mehrfach diskutiert, besteht die eigentliche Herausforderung bei dem Nukleinsäure-gestützten Nachweis von EHEC/STEC prinzipiell nicht so sehr in dem Nachweis sehr geringer Mengen an Zielorganismen, sondern vielmehr in der differenzierten Analyse und der Typisierung unterschiedlicher Shiga-Toxin-Gene und anderer putativer Pathogenitätsfaktoren (wie das für Intimin kodierende *eae*-Gen oder das für Enterohämolysin kodierende *hlyA*-Gen). Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher drei unterschiedliche aber relativ stark EHEC positive Proben mit ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL (# 1225343: *E. coli*, *stx*<sub>1c</sub>- und *hlyA*- positiv), mit ca.  $1 \times 10^5$  CFU/mL (# 1225344: *E. coli*, *stx*<sub>2e</sub>-positiv), und mit ca.  $1 \times 10^4$  CFU/mL (# 1225341: *E. coli* O157, *stx*<sub>1</sub>-, *stx*<sub>2</sub>-, *eae*- und *hlyA*-positiv), sowie eine Probe # 1225342 mit einem *E. coli* K12 Stamm (*eae*-, *hlyA*- negativ).

Die Verfügbarkeit von mittlerweile bestens etablierten NAT-gestützten Testsystemen und molekularbiologischen Differenzierungsstrategien für EHEC führte hier durchwegs zu hohen Richtigkeitsquoten - sowohl für positive als auch für negative Befunde. Von 85 der insgesamt 100 Teilnehmer wurden jedoch durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet.

Für die 6 falsch-negativen PCR-Resultate bei dem *stx*-1c positiven EHEC Isolat (# 1225343) sowie den 15 falsch-negativen PCR-Befunden bei dem *stx*-2e positiven EHEC Isolat (# 1225344) gibt es keine naheliegenden Erklärungen - eventuell decken die eingesetzten Testkonzepte der entsprechenden Teilnehmer nicht das gesamte zu erwartende Spektrum an "üblichen" *stx*-1 und *stx*-2 Genen ab. Aus wissenschaftlicher Sicht hätte man bei manchen PCR-Testsystemen allenfalls für *stx*-2f eine "diagnostische Lücke" erwarten können, da dessen Gensequenz bekanntermaßen relativ wenig Homologie zu den übrigen Shiga-Toxin Gensequenzen aufweist. Aber ein *stx*-2f positives EHEC Isolat war diesmal ja nicht dabei ...

Interessanterweise waren von den falsch-negativen EHEC Ergebnissen bei den Proben # 1225343 und # 1225344 vorwiegend Anwender mit *in-house* PCR-Assays und "anderen" PCR/NAT Testsystemen betroffen.

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

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

Zudem wurden von 88 der insgesamt 100 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, so waren diese Angaben zur Typisierung, zumindest in dem mitgeteilten Umfang, durchwegs korrekt.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: RealStar EHEC PCR Kit von Altona diagnostic (3x), Surefood pathogen STEC screening plus von Congen (2x) und LightMix Kit von TIB Molbiol (1x).



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

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *B. burgdorferi* sensu lato Genotypen, 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.

Im Umfeld des aktuellen Ringversuchs wollten wir uns bei der Auswahl von Art und Menge der Zielorganismen wieder auf die Abprüfung der analytischen Spezifität fokussieren. Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt daher eine Probe mit hoher Menge an *Borrelia afzelii* (# 1225353,  $\sim 1 \times 10^5$  Organismen/mL), eine Probe mit relativ hoher Menge an *Borrelia valaisiana* (# 1225352,  $\sim 1 \times 10^4$  Organismen/mL), eine Probe mit nennenswerten Mengen an *Borrelia duttonii* (# 1225354) sowie eine Probe, die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt (# 1225351).

Beginnen wir diesmal mit den "negativen Proben". Erfreulicherweise wurde die Probe # 1225351 (nur *E. coli*) von allen 99 Teilnehmern auch als korrekt negativ befundet. Bei der Probe # 1225354 (*Borrelia duttonii*) wurden von 5 Teilnehmern falsch-positive Befunde berichtet und von einem Teilnehmer wurde sie als "fraglich" klassifiziert. Daß beide Proben aber von dem Rest des Teilnehmerfeldes als korrekt negativ befundet wurden, deutet erneut auf eine praxistaugliche Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung sowie einer hinreichend hohen Spezifität der PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden.

Die positive Probe # 1225352 (*Borrelia valaisiana*,  $\sim 1 \times 10^4$  Organismen/mL), wurde von 95 der insgesamt 99 Teilnehmer als positiv befundet. Drei Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis und ein Teilnehmer bewertete diese Probe als "fraglich". Probe # 1225353 mit ca.  $10^5$  *Borrelia afzelii* Zielorganismen pro mL konnte von 98 der insgesamt 99 Teilnehmer als positiv befundet werden. Falsch-negative Ergebnisse bei den beiden hoch positiven Proben sollte den entsprechenden Teilnehmern Anlass geben, ihre Testsysteme und/oder die Aufarbeitung und DNA-Extraktion von Probenmaterialien zu überprüfen.

Im Gegensatz zu manch früheren Ringversuchen wurden diesmal keine Proben mit relativ geringen Mengen an Borrelien versandt. Die Herausforderung lag vielmehr auf der möglichst gleichmäßigen und zuverlässigen Erfassung unterschiedlicher Borrelien-Spezies.

Nach wie vor haben über die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; signifikante Inhibitionsereignisse der PCR-Reaktion wurde im Rahmen dieser Ringversuchsrunde von keinem der Teilnehmer beobachtet. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen zu beobachten. Die in zunehmendem Maße von den Teilnehmern eingesetzten kommerziellen Testsysteme "RealArt Borrelia" Testsystem, das mittlerweile mit dem Testcode [20] auf dem Ergebnisformular spezifiziert werden kann und das Demeditec GenFlow Testsystem (Code [21]) zeigen bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse (Tabelle 3) eine gute Performance.

Darüber hinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix Borrelia (3x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), EliGene *Borrelia* LC von Elisabeth Pharmacon (1x), Autoimmun Diagnostika GenID Zecken Screening Kit (1x), Sacace *Borrelia burgdorferi* sensu lato Real TM (1x) und Diarella *Borrelia* real time PCR kit von Gerbion (1x).

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

Aufgrund zahlreicher Anfragen hier eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für die **Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen zum Direktnachweis geringer Mengen an *Legionella pneumophila*** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise respiratorischem Probenmaterial) konzipiert. Einzelne Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets können daher typischerweise auch relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Aus diesem Grund ist eine Teilnahme an diesem Ringversuch nur für solche diagnostische Laboratorien 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 # 1225362, die mit einer Menge von ca.  $10^5$  CFU/mL an *Legionella pneumophila* Serogruppe 3 versetzt war. Die Proben # 1225363 und # 1225364 des aktuellen Sets enthielten jeweils  $10^4$  CFU/mL an *Legionella gormanii* und an *Legionella micdadei*. Die „negative“ Probe # 1225361, die im aktuellen Probenstet neben humanem Zellmaterial lediglich *E. coli* enthielt, wurde erfreulicherweise von allen der insgesamt 83 Teilnehmer als negativ befundet. Dies spricht wieder einmal für ein erfreulich gutes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Auch die relativ stark positive Probe # 1225362 wurde diesmal von nahezu allen der insgesamt 83 Teilnehmer korrekterweise als positiv befundet.

Probe # 1225364 enthielt mit ca.  $10^4$  Organismen pro mL eine etwa zehnfach geringere Menge an *L. micdadei*, deren DNA in den jeweiligen *L. pneumophila*-spezifischen PCR-Testsystemen von 78 Teilnehmern keine Kreuzreaktionen und die damit verbundenen falsch-positiven Ergebnisse zeigte. Probe # 1225363 enthielt mit ca.  $10^4$  Organismen pro mL eine nennenswerte Menge an *L. gormanii*. Hier wurde leider nur noch von 72 der insgesamt 83 Teilnehmer ein korrekt negatives PCR/NAT-Ergebnis für *L. pneumophila* berichtet.

Unter den Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis fanden sich überwiegend eigenentwickelte *real-time* PCR Protokolle mit 16S rDNA, dem *omp*- oder dem *mip*-Gen als spezifische Zielsequenz, sowie ein *nested* Block-Cycler PCR-Protokoll zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte. Letzteres Testkonzept sollte jedoch in jedem Fall die Unterscheidung zwischen *L. pneumophila* und *L. gormanii* bzw. *L. micdadei* erlauben, zumal sich diese Spezies auf Ebene der ribosomalen Speziesmarker deutlich voneinander unterscheiden. In Anbetracht der Reihenfolge der 4 ausgesandten Proben ist diesmal jedoch auch das Vorliegen von Kontaminationsereignissen durch Verschleppung o.ä. aus der *L. pneumophila*-positiven Probe # 1225362 während der individuellen Probenaufarbeitung oder Prozessierung nicht ganz unwahrscheinlich.

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs kamen bei insgesamt 36 Teilnehmern kommerzielle NAT-Testsysteme für den Nachweis von *L. pneumophila* DNA im Untersuchungsmaterial zum Einsatz. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix *Legionella* (8x), AmpliGnost *L.pneumophila* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (7x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit von (6x), GeneProof *L.pneumophila* PCR Kit (3x), Mikrogen Diagenode Lpn-050 Kit (3x) und Euroclone Duplica Real Time *L. pneumophila* Detection Kit (2x).

Von den anderen Teilnehmern wurden selbstentwickelte (*in house*) NAT Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet und von keinem der insgesamt 83 Teilnehmer wurde bei dem aktuell versandten Probenstet ein vermeintliches Inhibitionsereignis bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben beobachtet.

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

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt diesmal drei positive Proben in einer Art Verdünnungsreihe. Eine Probe mit relativ hoher Menge an Zielorganismen (# 1225371; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1225374; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (#1225372; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1225373), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Die Verfügbarkeit von spezifischen und mittlerweile gut evaluierten selbstentwickelten bzw. kommerziellen NAT-gestützten Analysesystemen führte diesmal bei allen 4 Proben des Ringversuchssets zu sehr hohen Richtigkeitsquoten. Im Gegensatz zu manch früheren *Salmonella enterica* PCR/NAT-Ringversuchen war diesmal kein falsch-positives Ergebnis bei der "negativen Probe" # 1225373 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 12 Teilnehmern durchwegs korrekte Ergebnisse bei der negativen Probe # 1225373 sowie bei der Probe # 1225371 mit relativ hoher Menge an Zielorganismen mitgeteilt. Lediglich die etwas schwächer positive Probe (# 1225374; *Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) wurde von einem Teilnehmer falsch-negativ befundet und bei der Probe #1225372 (*Salmonella enterica* ser. Typhimurium,  $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL) wurden 3 falsch-negative Ergebnisse mitgeteilt. Die Richtigkeitsquoten lagen somit wieder erfreulich hoch.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" von einem Teilnehmer die Verwendung des folgenden Kits aufgeführt: foodproof *Salmonella* detection kit der Fa. Bioteccon (1x) und Diarella *Salmonella* real time PCR Kit von Gerbion (1x).

In enger Abstimmung mit unserem Sollwert-Laboratorium (Dr. U. Busch, Dr. U. Messelhäuser, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit, Oberschleißheim) werden wir weiterhin versuchen, ab und an ein etwas exotischeres Serovar von *Salmonella enterica* zu versenden und zumindest eine der 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 # 1225381 und # 1225383, die diesmal eine relativ hohe Menge an *L. ivanovii* und *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 drei bzw. die Probe mit *L. ivanovii* von zwei der insgesamt 28 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 25 bzw. 26 der insgesamt 28 Teilnehmer. Bei diesem Ringversuch besteht nämlich explizit die Option einer differenzierten Befundmitteilung. Hält ein Teilnehmer lediglich ein ***L. monocytogenes*-spezifisches NAT-Verfahren** vor, so kann er dies über den **Zusatzcode [71]** im Ergebnisfeld angeben, und für die Erstellung des individuellen Zertifikats seitens INSTAND e.V. werden dann auch nur die *L. monocytogenes*-spezifischen Ergebnisse zur Bewertung herangezogen.

Im aktuellen Ringversuch sollte über die Aussendung von einer Probe mit relativ geringer Menge an *L. monocytogenes* Zielorganismen wieder einmal die untere Nachweisgrenze der derzeit eingesetzten Testsysteme abgeprüft werden. Probe # 1225384 enthielt folglich mit  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL eine relativ geringe Menge an *L. monocytogenes*, die erfreulicherweise von nahezu allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Lediglich zwei der insgesamt 28 Teilnehmer berichteten hier ein negatives Ergebnis - vermutlich wurde in diesem Fall ein Testsystem mit unzureichender analytischer Sensitivität verwendet. Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1225382), 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 Spezifität individueller Testkonzepte. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit dem aktuellen Ringversuch auch wieder standardisierter Rückstellproben mit non-*monocytogenes* Listerien zur Verfügung, die direkt über den Ringversuchsleiter zu beziehen sind.

Von allen 28 Teilnehmern wurden Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen verwendet. Vermeintliche Inhibitionsereignisse bei der Aufarbeitung und Analyse der Ringversuchsproben wurden nicht beobachtet. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix *L. monocytogenes* (2x), AmpliGnost *L. monocytogenes* von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (1x), Diarella *Listeria* real time PCR Kit von Gerbion (1x) und Ingenetix BactoReal *L. monocytogenes* (1x)

## **RV 539: MRSA**

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

Nach den zugegebenermaßen etwas umfangreichen und ausführlichen Diskussionen der Ergebniskonstellationen vorhergegangener MRSA Ringversuche kann die Auswertung des aktuellen Ringversuchs erfreulich kurz gehalten werden. Da wir diesmal, abgesehen von der Probe

#1225392, keine "schwierigen" oder komplexen Probenkonstellationen (die jedoch in der täglichen Praxis bekanntermaßen durchaus vorkommen können) versandt haben, wurden von den insgesamt 210 Teilnehmern mit ihren unterschiedlichsten NAT-gestützten Testsystemen nahezu durchgehend korrekte PCR Ergebnisse für 3 der insgesamt 4 Proben des aktuellen Panels berichtet.

Wie in Tabelle 1 der statistischen Auswertung dargestellt, enthielt die Probe # 1225391 eine relativ hohe Menge eines LA-MRSA Isolats (Lifestock-associated (LA-)MRSA; PVL-negativ;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL). Probe # 1225392 enthielt ein SCCmec-positives Methicillin-sensibles *Staphylococcus aureus* Isolat (MSSA; *mecA*-negativ, SCCmec-positiv, PVL-negativ, MLST 22, spa-Typ: t310;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL;). Probe # 1225393 enthielt diesmal ein Methicillin-sensibles aber PVL-positives *Staphylococcus aureus* Isolat (CA-MSSA; *mecA*-negativ, PVL-positiv;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml). Die letzte der 4 Proben (# 1225394), enthielt neben humanem Zellmaterial nur eine nennenswerte Menge an *E. coli*.

Auch wenn sich in der MRSA-positiven Probe # 1225391 eine relativ hohe Menge an entsprechenden Zielorganismen befand, so ist die diesmal beobachtete Richtigkeitsquote von 98 % als respektabel zu bezeichnen. Erfreulicherweise wurden für diese Probe von 204 der insgesamt 210 Teilnehmer korrekt positive Ergebnisse mitgeteilt. Auch die beiden MRSA-negativen Proben # # 1225393 und # 1225394 wurden von jeweils 207 Teilnehmern mit ihren PCR-gestützten MRSA-spezifischen Testsystemen als "negativ" getestet. Lediglich drei Teilnehmer beobachteten ein falsch-positives Ergebnis bei Probe # # 1225393. Bei der Probe # 1225394 wurde von zwei Teilnehmern ein falsch-positives Ergebnis berichtet und ein Teilnehmer hatte sein Ergebnis hier als "fraglich" klassifiziert. Die insgesamt 5 falsch-positiven Ergebnisse bei den letzteren beiden Proben (PVL-positiver *S. aureus* bzw. *E. coli*) könnten wohl am ehesten auf isoliert auftretende Kontaminationsereignisse mit MRSA DNA während der Probenaufarbeitung oder Amplifikation bzw. Detektion verursacht worden sein. Aber solche "Ausreißer" sind bei technisch aufwändigen Ringversuchen mit über 200 Teilnehmern nichts Ungewöhnliches und bedürfen meines Erachtens keiner weiteren Diskussion. Insgesamt bleibt festzuhalten, daß der erfreulich große Anteil von richtig-positiven Ergebnissen bei der einen positiven Probe und die überwiegend richtig-negativen Befunde bei 2 der 3 MRSA-negativen Proben erneut für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminations- und Verschleppungsereignissen spricht.

Die augenscheinlich "schlechte Datenlage" bei der MRSA-negativen Probe # 1225392 ist bei näherer Betrachtung schnell erklärt. Hierbei handelt es sich um ein zugegebenermaßen eher exotisches *S. aureus* Patientenisolat, das zur Gruppe der sogenannten ***mecA*-dropout MSSAs** (Oxacillin-empfindliche *S. aureus* Isolate, die auf Genomebene zwar eine der MRSA-typischen SCCmec Kassetten aufweisen, die jedoch kein funktionelles *mecA* Gen tragen) gezählt werden kann. 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 SCCmec-Kassette im *S. aureus* Genom beruhen. Um eine möglichst breite Abdeckung der unterschiedlichen SCCmec Kassettentypen zu erreichen, muß hier im Rahmen eines Multiplex-PCR Ansatzes mit einer relativ komplexen Mischung unterschiedlicher Primer- und Sondensequenzen gearbeitet werden, wobei die resultierende Sensitivität und Spezifität maßgeblich von der Auswahl der einzelnen Primersequenzen und deren Positionierung um die Integrationsstelle der jeweiligen SCCmec Kassette herum bestimmt wird. Die Vorteile dieser Zielsequenz sind unumstritten – aber aufgrund der Multiplex-Problematik müssen im Rahmen der Testentwicklung gewisse Abstriche hinsichtlich der Abdeckung unterschiedlicher Sequenzvarianten gemacht werden, um unter dem Strich auch noch eine ausreichend gute Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Daher fallen zwangsläufig einige der gemeinhin als selten oder exotisch betrachteten SCCmec Sequenzvarianten sowie die getrennte Erfassung des resistenzvermittelnden *mecA* Gens durch das Raster. Die Limitationen von SCCmec-basierten Testkonzepten wurden im Rahmen einiger früherer Ringversuche bereits durch die "edukative" Aussendung von selteneren SCCmec Varianten eindrucksvoll aufgezeigt. Um das Spektrum möglicher *S. aureus* Sequenzvarianten in

gewisser Weise zu komplettieren, wurde mit der Probe # 1225392 des aktuellen Ringversuchs nun ein *S. aureus* Patientenisolat mit einer vorhandenen SCCmec Kasette aber fehlendem bzw. nicht funktionellem Oxacillin-resistenzvermittelndem *mecA*-Gen versandt. Diese *mecA*-dropout Isolate führen bei manchen SCCmec-gestützten PCR/NAT-Testkonzepten zwangsläufig zu falsch-positiven MRSA Ergebnissen.

Auch wenn solche *S. aureus mecA*-Deletionsmutanten in unseren Breiten wohl noch eher selten anzutreffen sind, so unterstreicht der relativ hohe Anteil von falsch-positiven PCR-Ergebnissen im aktuellen Ringversuch **die Wichtigkeit eines parallel durchgeführten kulturellen Nachweises von MRSA in klinischem Probenmaterial.**

Ungeachtet des verwendeten PCR/NAT-Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate jedoch ein positives MRSA Ergebnis für die besagte Probe # 1225392 fairerweise nicht als "falsch-positiv" bewertet. 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 55 der insgesamt 210 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und diesmal waren die Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchwegs korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise unter: Linde, H.J. und N. Lehn (2005) Dtsch. Med. Wochenschr. 130:2397-2401, oder Witte, W. et al. (2005) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24:1-5. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus* Isolaten findet sich beispielsweise in: Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. (2007) **26**:131-135.

**Klinische Relevanz von cMSSA Isolaten (Exkurs):** Probe # 1225393 enthielt diesmal ein PVL-positives Methicillin-sensibles *Staphylococcus aureus* Isolat, das (zumindest derzeit) zugegebenermaßen nicht sehr häufig in der Routinediagnostik angetroffen werden dürfte. Als Beleg für die Tatsache, daß auch in unseren Breiten durchaus PVL-positive MSSA Stämme vorkommen und diese unter Umständen auch ein erhöhtes pathogenes Potential aufweisen können, hier der entsprechende Fallbericht von Kollegen Dr. Jürgen Wenzel (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Regensburg):

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

molekularbiologische PVL-Testung im diagnostischen Ablaufschema eines mikrobiologischen Labors nur auf MRSA-Isolate beschränkt ist.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: HAIN Lifescience Genotype *Staphylococcus* (4x), BD Max GeneOhm MRSA (4x), Cepheid GeneXpert (4x), r-biopharm RIDAGENE MRSA PCR (2x), HAIN Lifescience Genotype MRSA (1x), TIB Molbiol LightMix (1x), Autoimmun Diagnostika Gen ID MRSA combi (1x) und Alere detect ready kit (1x).

### **RV 540: *Chlamydia pneumoniae***

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal eine Probe mit relativ hoher Menge an entsprechenden Zielorganismen (# 1225404; *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml) und eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1225401; *Chlamydia pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^2$  IFU/ml), eine Probe mit ca.  $\sim 1 \times 10^5$  IFU/ml *Chlamydia trachomatis* (# 1225402) zur Abprüfung der Testspezifität für *C. pneumoniae*, sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1225403), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt.

Wie auch schon in vorhergegangenen Ringversuchen zu beobachten war, so wird bei der Auswertung der Ergebnisse auch diesmal die hervorragende analytische Sensitivität und Spezifität der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysensysteme für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA eindrucksvoll aufgezeigt. Aus den in der Tabelle 2 aufgeführten Daten ist zu entnehmen, daß auch nahezu alle Teilnehmer die Zielorganismen in der positiven Probe # 1225404 sicher und zuverlässig nachweisen konnten. Angesichts der mit  $1 \times 10^4$  CFU/mL ehrlicherweise nicht gerade als "äußerst gering" zu bezeichnenden Menge an Zielorganismen sollten falsch-negative Ergebnisse bei den betroffenen 3 Ringversuchsteilnehmern Anlaß zur Überprüfung und Optimierung ihres jeweiligen NAT-gestützten Testsystems geben.

Erfreulicherweise wurden für die Probe # 1225402 (*C. trachomatis*) lediglich von zwei der insgesamt 93 Teilnehmer falsch-positive Ergebnisse berichtet. Bei den falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um Kreuzkontaminationen während der Probenextraktion und -abarbeitung oder, was bei der aktuellen Probenkonstellation am Wahrscheinlichsten erscheint, um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Aus diesem Grund sollten Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei den entsprechenden Proben versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Mit ca.  $10^2$  IFU pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1225401 diesmal eine sehr geringe Menge an *C. pneumoniae* Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 78 der insgesamt 93 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ähnlich wie bei vergleichbaren Proben aus den Ringversuchen im April 2009 und November 2008 (die damals auch von ca. zwei Drittel der Teilnehmer erfolgreich detektiert werden konnten) kann die Ergebniskonstellation mit dieser gering konzentrierten Probe als Hinweis darauf angesehen werden, daß die untere

Nachweisgrenze der gegenwärtig eingesetzten und z.T. auch bereits sehr gut evaluierten NAT-gestützten Analysesystemen für den Nachweis von *C. pneumoniae* DNA mit einer Menge von ca.  $10^2$  IFU/mL im Probenmaterial erreicht zu sein scheint. **Hinweis des Ringversuchsleiters:** Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet.

Bei der negativen Probe # 1225403 wurden von nahezu allen der 93 Teilnehmer durchwegs korrekt negative Ergebnisse berichtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Alle Teilnehmer haben entweder kommerzielle oder selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von *C. pneumoniae* DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion bei den vier versandten Proben innerhalb des aktuellen Ringversuchs wurde dabei von keinem der Teilnehmer beobachtet. Aufgrund des leider noch relativ geringen Anteils und der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 14 Teilnehmern die Verwendung des TIB Molbiol LightMix *C. pneumoniae* Testsystems angegeben (Code [21] auf dem Ergebnisformular) und sie konnten damit alle (bis auf einen Teilnehmer ?) eine Richtigkeitsquote von 100 %, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen.

Unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars u.a. die Verwendung folgender Testkits aufgeführt: AmpliGnost *C. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (7x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma /Chlamydophila pneumoniae* Real Time PCR (6x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (6x), GeneProof *C. pneumoniae* PCR Kit (3x), Mikrogen FTD Real Time PCR (1x) und AmpliSens *Mycoplasma /Chlamydophila pneumoniae* FRT PCR Kit (1x).

### **RV 541: *Mycoplasma pneumoniae***

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

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal zwei positive Proben: Probe # 1225412 mit einer hohen Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL) und Probe # 1225414 mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an Zielorganismen (*M. pneumoniae*,  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL). Um die Spezifität der Testsysteme abzuprüfen enthielt Probe # 1225413 diesmal nennenswerte Mengen an *Ureaplasma urealyticum* - eine zum Genus der Zielorganismen *Mycoplasma* verwandte Spezies. Im Ringversuchsprobenset befand sich zudem eine Probe ohne Zielorganismen (# 1225411), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen und probenmaterialähnlichen Proteinkomponenten enthielt.

Insgesamt betrachtet wurden im Rahmen der aktuellen Probensets von den Teilnehmern wieder erfreulich hohe Richtigkeitsquoten erzielt. So konnten nahezu alle der insgesamt 99 Teilnehmer die DNA der *M. pneumoniae* Zielorganismen in der relativ stark positiven Probe # 1225412



problemlos und zuverlässig nachweisen. Mit Ausnahme von drei Teilnehmern wurden von allen Laboratorien auch für die etwas schwächer positive Probe # 1225414 (ca.  $10^4$  Genomkopien/mL) durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet.

Bei der Probe # 1225412 mit *Ureaplasma urealyticum* wurden von 93 Teilnehmern korrekt negative Ergebnisse mit ihren jeweiligen *M. pneumoniae*-spezifischen Testsystemen beobachtet. Bei den 5 falsch-positiven Ergebnissen handelt es sich entweder um laborinterne Kontaminationsereignisse, um eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung oder um Kreuzreaktivitäten, die in der Verwendung von Testsystemen mit unzureichender Spezies-Spezifität begründet sind. Aus diesem Grund sollten Teilnehmer mit falsch-positiven Ergebnissen bei der Probe mit *Ureaplasma urealyticum* versuchen, die analytische Spezifität ihrer jeweiligen NAT-Testsysteme zu überprüfen und gegebenenfalls nachzubessern.

Ein Teilnehmer hat hier sein Ergebnis als „fraglich“ klassifiziert.

Die "negative" Probe # 1225411, die anstelle von Zielorganismen lediglich *E. coli* enthielt, wurde diesmal von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet. Dies deutet auf eine verbesserte Vorgehensweise hinsichtlich der Vermeidung von Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung und PCR/NAT-Analytik in den teilnehmenden diagnostischen Laboratorien hin. Hoffentlich bestätigt sich diese erfreuliche Beobachtung auch in den zukünftigen Ringversuchsrunden (und nicht nur dann, wenn sich diese negative Probe als Nummer 1 innerhalb des so versandten und vermutlich auch so abgearbeiteten 4-er Sets befindet).

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

Im Rahmen des aktuellen Ringversuchs wurde von 49 Teilnehmern die Verwendung von kommerziellen Testkits aufgeführt: LightMix *M. pneumoniae* [n=13], Qiagen *M. pneumoniae* [n=3], Minerva Venor Mp Testsystem [n=1] sowie "andere kommerzielle Testsysteme" [n=32]. Teilnehmer mit den ersten drei der aufgeführten Testkits konnten damit durchwegs Richtigkeitsquoten von 100 %, sowohl für die positiven als auch für die negativen Proben erzielen. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: AmpliGnost *M. pneumoniae* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (7x), Autoimmun Diagnostika Gen ID CAP Bac Kit (6x), Mikrogen Diagenode *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* Real Time PCR (6x), GeneProof *M. pneumoniae* PCR Detection Kit (4x), Minerva biolabs Onar Mp (2x), Mikrogen FTD Real Time PCR (1x) und AmpliSens *Mycoplasma/Chlamydomphila pneumoniae* FRT PCR Kit (1x).

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

Dieser seit kurzem neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Coxiella burnetii* ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Coxiella burnetii* DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets werden daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe: eine Probe mit sehr hoher Menge an Zielorganismen (# 1225422; *Coxiella burnetii*,  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1225423; *C. burnetii*,  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1225424; *C.*

*burnetii*,  $\sim 1 \times 10^3$  Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1225421), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Die relativ stark positive Probe # 1225422 mit ca.  $10^5$  Genomkopien/mL wurde diesmal von allen der insgesamt 20 Teilnehmer als positiv befundet. Auch die Probe # 1225423 des aktuellen Probesets mit einer etwa zehnfach geringeren Menge an *C. burnetii*, wurde ebenfalls von allen Teilnehmern mit ihren jeweiligen *C. burnetii*-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert.

Diese Ergebnislage deckt sich weitgehend mit den Beobachtungen aus den vorherigen Ringversuchen - Schwierigkeiten beim zuverlässigen Nachweis von *C. burnetii* DNA traten damals erst bei Proben mit ca.  $10^3$  Genomkopien pro mL auf. Diese untere Nachweisgrenze bestätigt sich auch diesmal: drei der insgesamt 20 Teilnehmer beobachteten für die schwach positive Probe # 1225424 (ca.  $10^3$  Genomkopien/mL) ein falsch-negatives Ergebnis und ein Teilnehmer klassifizierte sein Ergebnis als "fraglich". Ansonsten wurden selbst für die schwach positive Probe durchwegs korrekte Ergebnisse berichtet.

**Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei einer DNA-Aufreinigung aus 100  $\mu$ l Probenmaterial, einer Elution in 100  $\mu$ l (also ca. 100 Genomkopien in 100  $\mu$ l) und der Verwendung von 5  $\mu$ l template input entspricht diese Menge ca. 5 Genomkopien pro NAT-Reaktionsansatz. Abhängig von der verwendeten Zielsequenz des jeweiligen PCR-Testkonzepts muss dabei noch die Kopienzahl der entsprechenden Zielsequenz im Genom berücksichtigt werden (z.B. liegen ribosomale Gene wie die 16S rDNA typischerweise in 2 bis 10 Kopien pro Bakteriengenom vor und bei den unterschiedlichen erregerspezifischen Zielsequenzen muss zwischen sog. *multicopy* und *single-copy targets* differenziert werden). Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in der Probe # 1225424 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet.

Achtzehn der insgesamt 20 Teilnehmer gaben die Verwendung eines eigenentwickelten (*in-house*) PCR assays an; bei zwei dieser Teilnehmer war explizit das "Transposase Gen (IS1111)" als Zielsequenz vermerkt. Zwei der Teilnehmer verwendeten den vorkonfektionierten LightMix *C. burnetii* Kit der Fa. TIB Molbiol (Berlin) und beobachteten hiermit durchgehend korrekte Ergebnisse.

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

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

Dieser ebenfalls seit kurzem neu ins Ringversuchsprogramm aufgenommene Ringversuch "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT *Francisella tularensis*" ist **ausschließlich** für die Abprüfung von NAT-gestützten Methoden und Protokollen **zum Direktnachweis geringer Mengen an *Francisella tularensis* DNA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien konzipiert. Einige der positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets haben daher typischerweise relativ geringe Mengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe (siehe Tabelle 1): eine Probe mit sehr hohe Menge an Zielorganismen (# 1225433; *Francisella tularensis holarctica*,  $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1225432; *F. tularensis holarctica*,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1225431; *F. tularensis holarctica*,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1225434), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Ähnlich wie bei dem zuvor diskutierten Coxiellen-Ringversuch haben auch hier alle der 11 Teilnehmer die relativ stark positive Probe # 1225433 sowie die etwas schwächer positiven Proben # 1225432 und # 1225431 mit ihren NAT-gestützten Testsystemen korrekt identifiziert.

Gleichfalls wurde die *F. tularensis*-negative Probe # 1225434 von allen Teilnehmern erfreulicherweise durchgehend als negativ befundet. Dies spricht für ein gutes Funktionieren sowohl der bei den jeweiligen Teilnehmern etablierten Testsysteme als auch der implementierten laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

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

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

### **RV 560: *Pneumocystis jirovecii***

Dieser aktuell als "Proberingversuch" durchgeführte Ringversuch RV 560 "Pilzgenomnachweis PCR/NAT *Pneumocystis jirovecii*" war so konzipiert, dass er der RV-Leitung einen Überblick über die verfügbaren NAT-gestützten Methoden und Protokolle **zum Direktnachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA** in geeignetem klinischem Untersuchungsmaterialien verschaffen sollte. Zum orientierenden Herantasten an die unteren Nachweisgrenzen der im Anwenderkreis etablierten PCR/NAT-gestützten Testsysteme enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben drei positive Proben in einer Art von Verdünnungsreihe (siehe auch Tabelle 1): eine Probe mit hoher Menge an Zielorganismen (# 1225602; *Pneumocystis jirovecii*,  $\sim 1 \times 10^5$  Genomkopien/mL), eine mit etwa zehnfach geringerer Menge (# 1225604; *Pneumocystis jirovecii*,  $\sim 1 \times 10^4$  Genomkopien/mL), eine mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1225603; *Pneumocystis jirovecii*,  $\sim 1 \times 10^3$  Genomkopien/mL), sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1225601), die nur *E. coli* und eine Suspension aus humanen Zellen enthielt.

Erfreulicherweise haben an diesem „Probe“-ringversuch bereits 36 Laboratorien teilgenommen. Sowohl die relativ stark positive Probe # 1225602 mit ca.  $10^5$  Genomkopien/mL sowie die etwa 10-fach schwächer positive Probe # 1225604 mit ca.  $10^4$  Genomkopien/mL wurde von nahezu allen der insgesamt 36 Teilnehmer als positiv befundet. Selbst in der DNA-Präparation aus der schwach positiven Probe # 1225603 (ca.  $10^3$  Genomkopien/mL) gelang noch 34 teilnehmenden Laboratorien der sensitive und spezifische Nachweis von *Pneumocystis jirovecii* DNA mit ihren jeweils etablierten qualitativen oder quantitativen PCR-Testsystemen. Lediglich 7 der insgesamt 36 Teilnehmer berichteten bei dieser Probe ein negatives Ergebnis - vermutlich wurden in diesen Fällen Testsysteme mit etwas schlechterer analytischer Sensitivität verwendet. Bei der Probe ohne Zielorganismen (# 1225601), die ausschließlich humanes Zellmaterial und eine nennenswerte Menge an *E. coli* enthielt, wurden im Rahmen des aktuellen Ringversuchs keine falsch-positiven Ergebnisse beobachtet. Dies spricht unter anderem für ein hervorragendes Funktionieren von Test- bzw. laborspezifischen Maßnahmen zur Vermeidung von Kontaminationsereignissen.

Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde unter Code [26] "Andere kommerzielle Testsysteme" zusätzlich die Verwendung folgender Kits aufgeführt: AmpliGnost *P. jirovecii* PCR Kit von Priv. Inst. für Immunologie und Molekulargenetik Karlsruhe (8x), MycAssay *Pneumocystis* von Myconostica (3x), TIB Molbiol LightMix *Pneumocystis jirovecii* (3x) und Sacace *P. jirovecii (carinii)* Real TM (1x).

In den zukünftig ausgesandten 4-er Sets werden nach diesem erfreulichen Ergebnis sich immer positive Proben befinden, die relativ geringe Genommengen der entsprechenden Zielorganismen enthalten.

Aufgrund der noch relativ geringen Teilnehmerzahl bei den Ringversuchen RV 542, RV 543 und RV 560 sowie der nicht durchgehenden Spezifizierung von kommerziellen Testsystemen innerhalb des Teilnehmerfeldes lassen sich derzeit noch keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

November, 2012

To the participants of the  
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)  
for NAATs in Diagnostic Bacteriology  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 543, and 560)

**Dear Participant, dear Colleague,**

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

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

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

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

Further information as well as the documented and analysed results of the past rounds of our quality control and proficiency test program "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)" can be downloaded in form of pdf-files at "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style.

**New since 2009:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages). Hopefully you found this kind of external validation benefitting and you will continue to join the future rounds of our EQAS scheme in bacterial genome detection (NAT/ PCR).

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

With best personal regards,



**Prof. Dr. Udo Reischl**

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

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle,  
Dr. U. Busch, Dr. D. Frangoulidis, PD Dr. W. Splettstösser, PD Dr. G. Grass, Dr. I. Reiter-Owona**

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

### NOVEMBER 2012

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

Despite the relatively low amounts of *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* target organisms in the current set of QC samples, the availability of well-established commercial or *in-house* NAT-assays has led to a high portion of correct results.

The current set of QC samples contained two samples with similar amounts of *C. trachomatis* ( $\sim 1 \times 10^3$  IFU/mL and  $\sim 5 \times 10^3$  IFU/mL; sample # 1225303 and sample # 1225304), two samples with similar amounts of *N. gonorrhoeae* ( $\sim 1 \times 10^3$  CFU/mL and  $\sim 5 \times 10^3$  CFU/mL; sample # 1225304 and sample # 1225302), and one sample without target organisms (# 1225301).

Despite relatively low amounts of *C. trachomatis* target cells in the positive samples #1225303 and # 1225304, among the *Chlamydia trachomatis*-specific results reported by the 137 participants, only 5 false-negative results were observed. Among the *N. gonorrhoeae*-specific results, false-negative results were reported by 21 of the 137 participants for sample # 1225304, which contained *N. gonorrhoeae* target organisms in an amount of  $1 \times 10^3$  CFU/mL next to *C. trachomatis* organisms. For sample # 1225302, which contained with  $5 \times 10^3$  CFU/mL similar amounts of *N. gonorrhoeae* target organisms, interestingly only 4 false-negative results were reported from 137 participants. The reason for this finding remains unclear. Certain competitiveness of primer molecules present in the reaction mixture would be conceivable. But it is to assume that for chlamydial and gonococcal NAT systems specific amplification of specific genomic regions of these two different target organisms is realized via two different primer sets and no consensus primers are used. Because the amount of target organisms in samples #1225302 and #1225304 with  $5 \times 10^3$  or  $1 \times 10^3$  CFU/mL could not be considered as "extremely low", false negative results should give rise to review and optimize their respective gonococcal specific NAT-based test system.

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

The current set of QC samples contained two samples with the same amount ( $\sim 1 \times 10^3$  IFU/mL) of *C. trachomatis* target organisms (# 1225311 and # 1225312) and two samples without target organisms (# 1225313 and # 1225314) containing only non-infected human cells and *Escherichia coli*.

As depicted in table 2 of statistical analysis, for sample #1225311 all results were correct while for sample # 1225312 false-negative results were reported by only 3 of the 108 participants. For both "negative" samples # 1225313 and # 1225314, only one false-positive result was observed by one of the 108 participants. Also, no results were classified as "questionable". This striking match of the current results with observations and accuracy rates in previous interlaboratory tests can, at least indirectly, be considered as evidence of a high reliability and consistency of the test systems used and the processing of the samples.

Run controls were performed by all 108 participants and no inhibition events were observed with the samples of the current distribution. False-negative and false-positive results should be a source of verification and optimization of the respective NAT-based testing system.

Overall, a very good diagnostic performance was observed for the *C. trachomatis*-specific NAT assays used by the 108 participants of the current distribution.

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

The current set of QC samples contained one sample with a relatively high amount of *Bordetella pertussis* (# 1225321;  $1 \times 10^5$  CFU/mL), one sample with an approximately hundredfold lower

number of *Bordetella pertussis* (# 1225324;  $1 \times 10^3$  CFU/mL), one negative sample containing *Bordetella parapertussis* (# 1225322 with  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), as well as one sample containing only non-infected human cells and *Escherichia coli* (# 1225323).

The availability of well-established commercial or in-house NAT-assays has led to a high portion of correct results. Only 1 of the 106 participants reported false-positive results for the *B. parapertussis*-negative sample # 1225322. The false-positivity issue is probably due to contamination events in the course of sample preparation or low specificity of the used PCR/NAT test system. For sample #1225324 ( $10^3$  CFU/mL of *B. pertussis*) 11 false-negative and 3 questionable results were observed. With an amount of  $10^3$  CFU / mL of *B. pertussis* target organisms is approached obviously at the lower limit of detection of appropriate test systems. Given the relatively small amount of target organisms in the sample # 1225324 reported results were not included in the assessment for the certificates. This is also characterized by the two gray shaded boxes in Table 2.

For the detection of *B. pertussis*, most participants used self-developed (in house) test systems with inhibition and/or positive controls. Therefore, 53 participating laboratories used IS481 insertion sequence, 9 the pertussis toxin coding gene and 2 ribosomal genes. Run controls were performed by 104 of 106 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 # 1225333 contained approximately  $1 \times 10^5$  CFU/ml of a Clarithromycin-susceptible *Helicobacter pylori* patient strain, and sample # 1225332 contained approximately  $10^5$  CFU/ml of a Clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* isolated from a patient in the course of an antibiotic therapy failure study. Only one of the 41 participants reported false-negative results for sample # 1225333, while 7 reported false-positive results for sample # 1225331. This sample contained a culture suspension of the related species *Helicobacter mustelae* (# 1225331;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), which therefore was correctly reported "negative" by 34 of the 41 participants. Sample #1225334, which contained only *E.coli* culture suspension was correctly reported as "negative" by all participants.

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 # 1225332) 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**

As discussed before, the challenge in the NAT-based detection of EHEC / STEC is not the detection of small amounts of target organisms, but rather the sophisticated analysis and typing of different Shiga toxin genes and other putative pathogenicity (such as the *eae* gene encoding intimin or the *hlyA* gene encoding enterohemolysin).

The current set of QC samples contained three samples positive for EHEC: # 1225341 (*E. coli*,  $1 \times 10^4$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub>-positive, *stx*<sub>2</sub>-positive, *eae*-positive, *hlyA*-positive and O157-positive), # 1225343 (*E. coli*,  $1 \times 10^5$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1c</sub>-positive, *stx*<sub>2</sub>-negative, *eae*-negative, and *hlyA*-positive) and # 1225344 (*E. coli*,  $1 \times 10^5$  CFU/mL, clinical isolate, *stx*<sub>1</sub>-negative, *stx*<sub>2e</sub>-positive, *eae*-negative and *hlyA*-negative). The other EHEC-negative sample contained an *eae*- and *hlyA*-negative *E. coli* K12 strain (# 1225342).

The use of well established NAT assays lead to high accuracy rates for correct results. The cause for 6 false-negative results for *stx-1c* positive EHEC (#1225343) and 15 false-negative results for *stx-2e* positive EHEC isolate (# 1225344) remain unclear. Maybe the common spectrum of *stx-1* and *stx-2* genes is not fully covered by the applied test systems. A false negative result in some PCR test systems could have been expected for *stx-2f*, because of the known little homology to other shiga toxin gene sequences, but a *stx-2f* EHEC positive isolate was not included this time. Interestingly, mainly self-developed in-house PCR assays were affected producing false-negative results of sample # 1225343 and # 1225344. Since in most of the participating laboratories, a NAT-based detection of shiga toxin coding genes is used primarily as a culture confirmation test, most future positive samples will contain relatively high amounts of target organisms. The focus will remain on the analytical specificity of the used test systems and less on the lower detection limit obtained.

Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 88 of the 100 participating laboratories and the reported results were correct when performed.

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

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

The current distribution of QC samples contained one sample with *Borrelia valaisiana* (# 1225352;  $\sim 1 \times 10^4$  organisms/mL), one sample with *Borrelia afzelii* (sample # 1225353;  $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL), and one sample with *Borrelia duttonii* (# 1225354). Sample # 1225351 contained no *Borrelia* organisms but only human cells and *E. coli* cells.

In contrast to some previous interlaboratory tests, no samples with relatively low amounts of *Borrelia* were included, so the challenge was rather on the reliable detection of different *Borrelia* species.

Sample # 1215351 of the current set contained non-infected human cells and *Escherichia coli* organisms. Fortunately, all of the participating laboratories tested this sample correctly as "negative". For sample # 1225354 (*Borrelia duttonii*) 5 false-positive and one "questionable" result was observed.

Positive sample of *Borrelia valaisiana* (# 1225352,  $1 \times 10^4$  organisms/mL) was tested positive by 95 of the 99 participating laboratories, while 3 participants reported false negative and 1 "questionable" result. Sample # 1225353 containing  $10^5$  *Borrelia afzelii* organisms, was tested positive by 98 participants.

Since only 5 false-positive results were observed for the truly "negative" sample, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. The participants who reported false-positive results should check their analytical workflow and/or NAT assay concepts for the possibility of contaminating events.

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

Next to the two commercial assays provided with a designated code number (RealArt *Borrelia* (Code [20]) and Demeditec GenFlow (Code [21])), participants indicated the use of the following commercial assays or kits on their report form: TIB Molbiol LightMix *Borrelia* (3x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (1x), EliGene *Borrelia* RT von Elisabeth Pharmacon (1x), EliGene *Borrelia* LC von Elisabeth Pharmacon (1x), Zecken Screening Kit von Autoimmun Diagnostika (1x), Diarella *Borrelia* real time PCR Kit von Gerbion (1x) und Sacace *Borrelia burgdorferi sensu lato* Real-TM (1x).



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

The current set of QC samples contained only one positive sample with *Legionella pneumophila* serogroup 3 (# 1225362;  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL), as well as two samples containing *Legionella gormanii* (# 1225363;  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) and *Legionella micdadei* (# 1225364;  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL). Sample # 1225361 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

The *L. pneumophila*-positive sample # 1225362 was correctly tested positive by nearly every of the 83 participating laboratories. As expected, a higher number of "false-positive" results were observed in the current QC distribution with the samples containing significant amounts of *Legionella gormanii* (# 1225363) and *Legionella micdadei* (# 1225364) - species closely related to the target organism *L. pneumophila*. While 78 of the participants reported (correct) negative results for the *L. micdadei*, for *L. gormanii* samples, only 72 of the 83 participants reported correct results. However, colleagues who observed such a cross-reaction with their in-house assays and are aiming at a high analytical performance should consider improving the sensitivity and/or checking the species coverage of their individual assay concepts.

Participants who reported false-positive results used mainly self-developed (in house) realtime PCR protocols with 16S rDNA-, *omp*- and *mip*-coding genes or a nested block-cycler PCR protocol with subsequent nucleotide sequencing of the amplified 16S rDNA region, which should allow however the distinction between *L. pneumophila* and *L. gormanii* or *L. micdadei* in any case, since this species clearly differ at the level of the ribosomal marker. The presence of contamination events however is not entirely unlikely due to sample order and carryover from the *L. pneumophila* positive sample # 1225362 during the individual sample preparation or processing.

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

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium: sample # 1225371 contained  $1 \times 10^5$  CFU/ml, sample # 1225374 contained  $1 \times 10^4$  CFU/ml and sample # 1225372 contained  $1 \times 10^3$  CFU/ml. Sample # 1225373 contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Only one false-negative result was reported for the weak positive sample # 1225374, no false-positive results were reported for the negative sample # 1225373 and also sample # 1225371 containing relatively high amounts of cells was reported correctly. This indicates a remarkably high analytical sensitivity of the current *Salmonella enterica*-specific PCR assays and an improved procedure with regard to the prevention of contamination events during the individual sample preparation and PCR/NAT analytics in the participating diagnostic laboratories.

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

The current set of QC samples contained a sample without the corresponding target organisms (# 1225382; only *E. coli* cells), one sample positive for *L. monocytogenes* (# 1225384 with  $1 \times 10^4$  CFU/ml) and two samples with *Listeria ivanovii* (# 1225381) and *Listeria innocua* (# 1225383) as a *Listeria* species other than *L. monocytogenes*.

In order to test the specificity of individual test systems, the samples # 1225381 and # 1225383 contained relatively high amounts of non-*monocytogenes* species: *L. ivanovii* and *L. innocua*, respectively. For *L. innocua* 3 of the 28 participating laboratories and for *L. ivanovii* accordingly 2 were tested "positive" for *Listeria spp.* DNA. Background of this slightly irritating result in the statistical analysis (table 2) is the almost exclusive use of *L. monocytogenes*-specific NAT-test systems, which allow no selective detection of non-*monocytogenes Listeria* species. Otherwise, the data then speaks for a pleasingly high specificity of *L. monocytogenes*-specific test systems by 25 (*L. innocua*) or 26 (*L. ivanovii*) of the 28 participants.

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

1225384 and the corresponding DNA preparations tested positive by the PCR assays applied by 26 of the 28 participants.

No false-positive results were observed for sample # 1225382 containing only *E. coli* cells, so it seems that the majority of participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

### **RV 539: MRSA**

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

As no "difficult" sample was included into the panel almost consistently correct PCR results were obtained for 3 of the 4 samples of the current panel of a total of 210 participants with their NAT-based test systems.

Sample # 1225391 of the current set contained significant numbers of La-MRSA organisms (PVL-negative,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml). Although this was not a real challenge regarding the analytical sensitivity of the PCR assays used, it is really nice to see that this MRSA positive sample was tested positive by 98 % of the 210 participants.

Sample # 1225393 contained a methicillin-susceptible *S. aureus* isolate (cMSSA, PVL-positive,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml). Sample # 1225392 contained a clinical isolate of a methicillin-susceptible *S. aureus* strain (*mecA*-negative, but SCC positive ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL)). This two MRSA negative samples, # 1225393 and # 1225394 were tested by each 207 participants with their PCR-based MRSA-specific test systems as "negative" and only three participants observed a false positive result for sample # 1225393. Sample # 1225394 with a false positive result was reported by two participants and a participant had classified his result as "questionable". The five false positive results for the latter two samples (PVL positive *S. aureus* or *E. coli*) may have been caused probably most likely occurring in isolated events of contamination with MRSA DNA during the sample preparation, amplification or detection.

Overall, it should be noted that a pleasingly large proportion reported a correct result and the predominantly correct negative findings for 2 of the 3 MRSA negative samples speaks again for an excellent working of testing or laboratory-specific measures to avoid the risk of contamination and carry-over events.

The apparent "bad evidence" for the MRSA negative sample # 1225392 is quickly explained on closer inspection. This sample contained a rather exotic aureus patient isolate, that belongs to the group of so-called ***mecA* - dropout MSSA** (Oxacillin sensitive *S. aureus* with MRSA-typical SCCmec cassette, but no functional *mecA* gene).

In order to achieve a broad coverage of the different types of SCCmec cassette, you need to work with a multiplex PCR approach and a fairly complex mix of different primer and probe sequences. Due to the multiplex problematic certain cuts with regard to the coverage of different sequence variants must be made within the framework of the test development, for achieving enough sensitivity and specificity. Therefore some commonly known as rare or exotic considered SCCmec sequence variants, as well as the separated detection of resistance mediating *mecA* gene will fail inevitably. Even though such *S. aureus mecA* isolates are probably still rare in our latitudes, the relatively high number of false positive PCR results in current QC samples underlines the importance of a parallel cultural detection of MRSA in clinical specimens.

Altogether the results speaks apart from sample # 1225392 again for the high reliability of the NAT-based direct detection of MRSA in clinical specimens.

In the context of our test series the optional molecular detection of putative pathogenicity factor PVL (Panton-Valentine Leukocidin) or its coding gene *lukF/S-PV* was inquired. Corresponding results were communicated by 55 of the total 210 participating laboratories and this time the results for the molecular PVL testing were entirely correct.

#### **RV 540: *Chlamydia pneumoniae***

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

The current set of QC samples contained two samples positive for *C. pneumoniae*. Sample # 1225404 was spiked with  $\sim 1 \times 10^4$  IFU/ml of *C. pneumoniae* whereas sample # 1225401 contained an approximately hundredfold lower number of *C. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^2$  IFU/ml). Sample # 1225402 contained significant numbers of *Chlamydia trachomatis* organisms to assess analytical specificity. Only *E. coli* and non-infected human cells but no *C. pneumoniae* target organisms were present in sample # 1225403.

As depicted in table 2, only 3 false-negative results were observed for the positive sample # 1225404 ( $10^4$  IFU/mL). For the hundredfold weaker and therefore very low concentrated positive sample # 1225401 ( $10^2$  IFU/ml), still 78 from the 93 participants observed correctly positive results. The result with this low concentrated sample is an indication, that the lower detection limit of the currently employed and partly already very well evaluated NAT-based analysis systems for the detection of *C. pneumoniae* DNA is achieved with about  $10^2$  IFU/mL in the sample material.

Since nearly no false-positive results were observed for the "negative" sample # 1225403, it seems that the majority of participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. Three participants reported false-positive results for sample # 1225402 (*Chlamydia trachomatis*), which could be due to certain shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR / NAT assays.

Otherwise there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

#### **RV 541: *Mycoplasma pneumoniae***

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

The current set of QC samples contained two positive samples. A relatively high amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^5$  genome copies/mL) was present in sample # 1225412 and an approximately tenfold lower amount of *M. pneumoniae* ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL) was present in sample # 1225414. Sample # 1225413 was designed to monitor assay specificity: it contained a considerable amount of *Ureaplasma urealyticum* ( $\sim 1 \times 10^4$  genome copies/mL), a species of a genus related to

*Mycoplasma*. The set was completed by sample # 1225411, which contained only human cells and a considerable amount of *E. coli* organisms.

As also observed during the past distributions of our EQAS scheme for *Mycoplasma pneumoniae* PCR/NAT detection, the availability of well-established commercial or *in-house* PCR/NAT-assays has led to a surprisingly high percentage of correct results. Among the *M. pneumoniae*-specific results reported by the 99 participants, nearly all laboratories reported correct positive results for the relatively high positive sample # 1225412 and only 3 participants reported false-negative results for sample # 1225414, which contained  $10^4$  genome copies/mL.

Sample # 1225412, which contained *Ureaplasma urelyticum*, was tested correctly negative 93 of the 99 participants. Six participants reported false-positive results for the *Ureaplasma* sample, which could be due to certain shortcomings in analytical specificity or just cross-contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection steps. The affected laboratories are encouraged to improve their diagnostic workflow or to check the analytical specificity of their PCR / NAT assays.

Sample # 1225411 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. Since nearly no false-positive results were observed for the "negative" sample, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events. Otherwise there were no inhibition events or other noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

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

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

The current set of QC samples contained a kind of dilution series of *Coxiella burnetii* organisms in the sample matrix: sample # 1225422 contained about  $1 \times 10^5$  CFU/mL, sample # 1225423 about  $1 \times 10^4$  organisms/mL and sample # 1225424 about  $1 \times 10^3$  organisms/mL of a *Coxiella burnetii* strain.

A relatively high amount ( $10^5$  genome copies/mL) of *C. burnetii* organisms were present in sample # 1225422, which consequently was tested positive by all of the 20 participating laboratories. Sample # 1225423, which contained an approximately ten-fold lower number of *C. burnetii* target organisms per mL, was also tested "positive" by all of the 20 participants.

Sample # 1225424, which contained a relatively small amount of *C. burnetii* target organisms ( $\sim 1 \times 10^3$  organisms per mL), was reported "positive" by 16 of the 20 participating laboratories. This result is consistent with the observations from the previous interlaboratory tests - difficulties for the reliable detection of *C. burnetii* DNA then occurred for samples with about  $10^3$  genome copies per mL, which should be considered as the lower detection limit for this test.

Sample # 1225421 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells.

With the exception of three false-negative results and one equivocal/questionable result observed with the positive sample # 1225424 containing about  $1 \times 10^3$  target organisms, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and a good overall correlation with the expected results was observed.

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

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

The current set of QC samples contained three positive samples: a high amount of *Francisella tularensis holarctica* ( $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL) was present in sample # 1225433, an approximately ten-fold lower amount ( $\sim 1 \times 10^5$  CFU/mL) was present in sample # 1225432, and an approximately hundredfold lower amount ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) was present in sample # 1225431.

Positive samples #1225433, #1225432 and also the sample # 1225431 containing  $10^4$  CFU/mL were all correctly tested positive by all of the 11 participating laboratories.

As no false-positive result was observed for the "negative" sample # 1225434, it seems that the participating laboratories have implemented functional precautions to prevent deleterious contamination events.

Although the number of participating laboratories is still not very high, the current results indicate, that the lower limit of detection of the currently employed and partly already very well evaluated NAT-based analysis systems for the detection of *F. tularensis* DNA are expected to be significantly below an amount of approx.  $10^4$  organisms/mL sample material.

### **RV 560: *Pneumocystis jirovecii***

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

The set of QC samples contained a kind of dilution series of *Pneumocystis jirovecii* organisms in the sample matrix: sample # 1225602 contained about  $1 \times 10^5$  genome copies/mL, sample # 1225604 about  $1 \times 10^4$  genome copies/mL and sample # 1225603 about  $1 \times 10^3$  genome copies /mL of a *Pneumocystis jirovecii* isolate. Sample # 1225601 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells.

Samples # 1225602, which contained a relatively large amount of *P. jirovecii* target organisms ( $\sim 1 \times 10^5$  genome copies per mL) and # 1225604 which contained a ten-fold lower amount of *P. jirovecii* were reported "positive" by nearly all of the 36 participating laboratories. Even for the sample with relatively low amounts of target organisms, 34 correct "positive" results were reported by the 36 participants.

No false-positive results were observed for sample # 1225601, which contained no target organisms but only human cells and *E. coli* cells.

Due to the relatively small number of participants of RV 542, RV 543 and RV 560, still no serious comparisons between certain commercial tests and the very heterogenous group of self-developed (in house) test systems can be made regarding sensitivity, specificity or susceptibility to contamination.

**PCR-/NAT *C. trachomatis* & GO  
 (RV 530) November 2012**



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

*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225301	∅ / ∅	64	<i>Escherichia coli</i> K12
1225302	∅ / +	63	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 5x10 <sup>3</sup> CFU/mL)
1225303	+ / ∅	61	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)
1225304	+ / +	62	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 5x10 <sup>3</sup> IFU/mL) <i>Neisseria gonorrhoeae</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL)

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

*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 137</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1225301	1225302	1225303	1225304	1225301	1225302	1225303	1225304	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv CT</b>	1	0	131	20	n.d.	0	0	0	0
<b>Positiv CT &amp; GO</b>	0	0	2	116	nein / no	137	137	137	137
<b>Positiv GO</b>	1	133	0	0	ja / yes	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	135	4	4	1					
<b>Fraglich / questionable</b>	0	0	0	0					

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei**

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
GenProbe CT/NG [20] (n = 7)	14	14 / 21	67	7	7 / 7	100
LightMix CT/NG [21] (n = 10)	28	28 / 30	93	9	9 / 10	90
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 17)	45	45 / 51	88	17	17 / 17	100
COBAS Amplicor [23] (n = 8)	24	24 / 24	100	8	8 / 8	100
BD ProbeTec [24] (n = 17)	46	46 / 51	90	17	17 / 17	100
Artus CT [25] (n = 2)	5	5 / 6	83	2	2 / 2	100
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 27)	79	79 / 81	98	26	26 / 27	96
Other commercial tests [27] (n = 41)	117	117/123	95	40	40 / 41	98
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 14)	36	36 / 42	86	13	13 / 14	93
Andere / k.A. / other [29] (n = 12)	33	33 / 36	92	11	11 / 12	92

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.

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

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

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

NAT-Methode ( <b>nur CT</b> ) [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 7)	<b>21</b>	21 / 21	<b>100</b>	<b>7</b>	7 / 7	<b>100</b>
LightMix CT/NG [21] (n = 10)	<b>30</b>	30 / 30	<b>100</b>	<b>10</b>	10 / 10	<b>100</b>
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 17)	<b>51</b>	51 / 51	<b>100</b>	<b>17</b>	17 / 17	<b>100</b>
COBAS Amplicor [23] (n = 8)	<b>24</b>	24 / 24	<b>100</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>
BD ProbeTec [24] (n = 17)	<b>49</b>	49 / 51	<b>96</b>	<b>17</b>	17 / 17	<b>100</b>
Artus CT [25] (n = 2)	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 27)	<b>81</b>	81 / 81	<b>100</b>	<b>27</b>	27 / 27	<b>100</b>
Other commercial tests [27] (n = 41)	<b>120</b>	120/123	<b>98</b>	<b>40</b>	40 / 41	<b>98</b>
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 14)	<b>39</b>	39 / 42	<b>93</b>	<b>14</b>	14 / 14	<b>100</b>
Andere / k.A. / <i>other</i> [29] (n = 12)	<b>36</b>	36 / 36	<b>100</b>	<b>12</b>	12 / 12	<b>100</b>

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

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

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

NAT-Methode ( <b>nur GO</b> ) [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
GenProbe CT/NG [20] (n = 7)	<b>14</b>	14 / 21	<b>67</b>	<b>7</b>	7 / 7	<b>100</b>
LightMix CT/NG [21] (n = 10)	<b>28</b>	28 / 30	<b>93</b>	<b>9</b>	9 / 10	<b>90</b>
Roche COBAS TaqMan [22] (n = 17)	<b>45</b>	45 / 51	<b>88</b>	<b>17</b>	17 / 17	<b>100</b>
COBAS Amplicor [23] (n = 8)	<b>24</b>	24 / 24	<b>100</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>
BD ProbeTec [24] (n = 17)	<b>48</b>	48 / 51	<b>94</b>	<b>17</b>	17 / 17	<b>100</b>
Artus CT [25] (n = 2)	<b>5</b>	5 / 6	<b>83</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>
Abbott RealTime CT/NG [26] (n = 27)	<b>79</b>	79 / 81	<b>98</b>	<b>26</b>	26 / 27	<b>96</b>
Other commercial tests [27] (n = 41)	<b>120</b>	120/123	<b>98</b>	<b>41</b>	41 / 41	<b>100</b>
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 14)	<b>39</b>	39 / 42	<b>93</b>	<b>13</b>	13 / 14	<b>93</b>
Andere / k.A. / <i>other</i> [29] (n = 12)	<b>33</b>	33 / 36	<b>92</b>	<b>11</b>	11 / 12	<b>92</b>

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



**PCR-/NAT *Chlamydia trachomatis*  
 (RV 531) November 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225311	<b>+</b>	<b>61</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)
1225312	<b>+</b>	<b>61</b>	<i>Chlamydia trachomatis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> IFU/mL)
1225313	<b>∅</b>	<b>62</b>	<i>Escherichia coli</i> K12
1225314	<b>∅</b>	<b>62</b>	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 108</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
<i>Befund Result</i>	<b>1225311</b>	<b>1225312</b>	<b>1225313</b>	<b>1225314</b>	<b>1225311</b>	<b>1225312</b>	<b>1225313</b>	<b>1225314</b>	
<b>Positiv</b>	<b>108</b>	<b>105</b>	<b>1</b>	<b>0</b>	n.d.	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Negativ</b>	<b>0</b>	<b>3</b>	<b>107</b>	<b>108</b>	nein no	<b>108</b>	<b>108</b>	<b>108</b>	<b>108</b>
<b>Fraglich Questionable</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	ja yes	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>GenoQuick CT (Hain) [20] (n = 20)</b>	<b>39</b>	39 / 40	<b>98</b>	<b>39</b>	39 / 40	<b>98</b>
<b>LightMix CT [21] (n = 1)</b>	<b>1</b>	1 / 2	<b>50</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>
<b>Roche COBAS TaqMan [22] (n = 27)</b>	<b>54</b>	54 / 54	<b>100</b>	<b>54</b>	54 / 54	<b>100</b>
<b>COBAS Amplicor [23] (n = 2)</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>
<b>BD ProbeTec [24] (n = 13)</b>	<b>25</b>	25 / 26	<b>96</b>	<b>26</b>	26 / 26	<b>100</b>
<b>Artus CT [25] (n = 10)</b>	<b>20</b>	20 / 20	<b>100</b>	<b>20</b>	20 / 20	<b>100</b>
<b>Abbott CT/NG [26] (n = 6)</b>	<b>12</b>	12 / 12	<b>100</b>	<b>12</b>	12 / 12	<b>100</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 14)</b>	<b>28</b>	28 / 28	<b>100</b>	<b>28</b>	28 / 28	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 11)</b>	<b>22</b>	22 / 22	<b>100</b>	<b>22</b>	22 / 22	<b>100</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 4)</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225321	+++	61	<i>Bordetella pertussis</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225322	∅	62	<i>Bordetella parapertussis</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1225323	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225324	+	61	<i>Bordetella pertussis</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL)

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

<i>n = 106</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	<i>1225321</i>	<i>1225322</i>	<i>1225323</i>	<i>1225324</i>		<i>1225321</i>	<i>1225322</i>	<i>1225323</i>	<i>1225324</i>
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	106	1	0	92	n.d.	2	2	2	2
<b>Negativ</b>	0	105	106	11 <sup>1)</sup>	nein <i>no</i>	104	104	104	104
<b>Fraglich</b> <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 Anwenden verschiedener Methoden.**

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 45)</b>	<b>88</b>	88 / 90	<b>98</b>	<b>90</b>	90 / 90	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 57)</b>	<b>102</b>	102/111 §	<b>92</b>	<b>113</b>	113 / 114	<b>99</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 4)</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>

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

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample #1225324 contained a very low number of *Bordetella pertussis* 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 *Helicobacter pylori*  
 (RV 533) November 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225331	∅	62	<i>Helicobacter mustelae</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225332	++	61/71	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) Clarithromycin resistant (GGA & GTA mut. in 23S rDNA)
1225333	++	61/72	<i>Helicobacter pylori</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) Clarithromycin susceptible (wildtype 23S rDNA sequence)
1225334	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 41</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1225331	1225332	1225333	1225334	1225331	1225332	1225333	1225334	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	7	41 <sup>1)</sup>	40 <sup>1)</sup>	0	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	34	0	1	41	nein <i>no</i>	41	41	41	41
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
Ingenetix ClariRes [26] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	6 / 6	100
Commercial assay [27] (n = 14)	27	27 / 28	96	25	25 / 28	89
In house PCR assay [28] (n = 24)	48	48 / 48	100	45	45 / 48	94
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	3	3 / 4	75

\* 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:** <sup>1)</sup> Twenty nine of the 41 participants reported results for molecular Clarithromycin-susceptibility testing. With the exception of 1 laboratory, all reported results were correct.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225341	++	61 / 71,72,77,78	EHEC (~1x10 <sup>4</sup> CFU/mL) ( <i>stx-1</i> , <i>stx-2</i> , <i>eae</i> , <i>hlyA</i> and O157 positive)
1225342	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12 (negative for <i>eae</i> and <i>hlyA</i> )
1225343	+++	61 / 71,78	EHEC (~1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) ( <i>stx-1c</i> and <i>hlyA</i> positive)
1225344	+++	61 / 72	EHEC (~1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) ( <i>stx-2e</i> positive)

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

<i>n = 100</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1225341	1225342	1225343	1225344	1225341	1225342	1225343	1225344	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	100 <sup>1)</sup>	0	94 <sup>1)</sup>	85 <sup>1)</sup>	n.d.	3	3	3	3
<b>Negativ</b>	0	100	6	15	nein <i>no</i>	97	97	97	97
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
GenoType EHEC (Hain) [20] (n = 21)	62	62 / 63	98	21	21 / 21	100
Hyplex EHEC [21] (n = 5)	15	15 / 15	100	5	5 / 5	100
RIDAGENE (r-Biopharm) [22] (n = 8)	23	23 / 24	96	8	8 / 8	100
Other commercial tests [27] (n = 12)	31	31 / 36	86	12	12 / 12	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 54)	150	150 / 162	93	54	54 / 54	100
<i>Anderer/ k.A. / other</i> [29] (n = 1)	1	1 / 3	33	1	1 / 1	100

**Comments:** <sup>1)</sup> Partial or complete shiga-toxin subtyping, *eae*-, and *hlyA*-detection was performed by 88 laboratories.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225351	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225352	++	61	<i>Borrelia valaisiana</i> (~1x10 <sup>4</sup> organisms/mL)
1225353	+++	61	<i>Borrelia afzelii</i> (~1x10 <sup>5</sup> organisms/mL)
1225354	∅	62	<i>Borrelia duttonii</i>

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

<i>n = 99</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	1225351	1225352	1225353	1225354		1225351	1225352	1225353	1225354
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	0	95	98	5	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	99	3	1	93	nein <i>no</i>	98	98	98	98
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	1	0	1	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

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

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

artus *Borrelia* LC kit (Qiagen)

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
artus <i>Borrelia</i> LC Kit [20] (n = 20)	40	40 / 40	100	40	40 / 40	100
Demeditec GenFlow [21] (n = 10)	19	19 / 20	95	20	20 / 20	100
Other/commercial tests [27] (n = 12)	24	24 / 24	100	23	23 / 24	96
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 57)	110	110 / 113 §	97	109	109 / 113 §	96

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

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225361	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225362	+++	61	<i>Legionella pneumophila</i> SG3 (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225363	∅	62	<i>Legionella gormanii</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1225364	∅	62	<i>Legionella micdadei</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)

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

<i>n</i> = 83	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1225361	1225362	1225363	1225364		1225361	1225362	1225363	1225364
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	0	83	11	4	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	83	0	72	78	nein <i>no</i>	82	82	82	81
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	1	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>	%
Other commercial tests [27] (n= 36)	36	36 / 36	100	103	103 / 107 <sup>§</sup>	96
In house PCR assay [28] (n= 45)	45	45 / 45	100	125	125 / 135	93
Andere / k.A. / other [29] (n= 3)	3	3 / 3	100	8	8 / 9	89

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

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

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



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

*Sample composition and expected results.*

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225371	+++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225372	+	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 1x10 <sup>3</sup> CFU/mL)
1225373	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225374	++	61	<i>S. enterica</i> ser. Typhimurium (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)

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

*Absolute numbers of reported individual results.*

<i>n = 12</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>					
<i>Befund Result</i>	1225371	1225372	1225373	1225374	1225371	1225372	1225373	1225374		
<b>Positiv</b>	12	9	0	11	n.d.	0	0	0	0	
<b>Negativ</b>	0	3 <sup>1)</sup>	12	1	nein no	12	12	12	12	
<b>Fraglich Questionable</b>	0	0	0	0	ja yes	0	0	0	0	

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 5)</b>	<b>15</b>	15 / 15	<b>100</b>	<b>5</b>	5 / 5	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 8)</b>	<b>20</b>	20 / 24	<b>83</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>

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

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample #1225372 contained a very low number of *S. enterica* ser. Typhimurium 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 *Listeria* spp.  
 (RV 538) November 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225381	++	61 /72	<i>Listeria ivanovii</i> ATCC 19119
1225382	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225383	++	61 /74	<i>Listeria innocua</i>
1225384	++	61 /71	<i>Listeria monocytogenes</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)

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

<i>n = 28</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
	1225381	1225382	1225383	1225384	1225381	1225382	1225383	1225384	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	3	0	2	26	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	25 <sup>1)</sup>	28	26 <sup>1)</sup>	2	nein <i>no</i>	28	28	28	28
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
Other commercial tests [27] (n = 7)	7	7 / 21	33	7	7 / 7	100
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 21)	24	24 / 63	38	21	21 / 21	100

**Comments:** <sup>1)</sup> Due to the predominant use of *L. monocytogenes*-specific PCR assays, negative PCR results with samples # 1225381 and # 1225383 were not rated as "false negative".



## PCR-/NAT MRSA / cMRSA (RV 539) November 2012



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

	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1225391	++	61 / 72	LA-MRSA ( <i>S. aureus</i> , oxa <sup>R</sup> , PVL-neg) (~ 10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225392	∅	62 / 72	MSSA (SCCmec pos, mecA neg, spa:t 310) (~10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225393	∅	62 / 71,72	cMSSA ( <i>S. aureus</i> , oxa <sup>S</sup> , PVL-pos) (~ 10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225394	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 210	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	1225391	1225392	1225393	1225394		1225391	1225392	1225393	1225394
Befund Result									
Positiv	204	145	3	2	n.d.	0	0	0	0
Negativ	4	63	207 <sup>1)</sup>	207	nein no	210	210	210	209
Fraglich Questionable	2	2	0	1	ja yes	0	0	0	1

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

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
BD GeneOhm MRSA [20] (n=31)	31	31 / 31	100	65	65 / 93	70
GenoType MRSA Direct [21] (n=29)	29	29 / 29	100	60	60 / 87	69
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=4)	4	4 / 4	100	12	12 / 12	100
LightCycler Kits [23] (n=1)	1	1 / 1	100	3	3 / 3	100
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=55)	55	55 / 55	100	123	123 / 163 <sup>§</sup>	75
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=25)	24	24 / 25	96	63	63 / 74 <sup>§</sup>	85
LightMix MRSA (TIB Molbiol) [26] (n=1)	1	1 / 1	100	3	3 / 3	100
Commercial assay kit [27] (n=23)	23	23 / 23	100	58	58 / 69	84
In house PCR assay [28] (n=42)	37	37 / 40 <sup>§</sup>	93	106	106 / 125 <sup>§</sup>	85
Andere / k.A. / other [29] (n=15)	15	15 / 15	100	35	35 / 45	78

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

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

Comments: <sup>1)</sup> A dedicated cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 55 laboratories. All reported results were correct.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225401	<b>(+)</b>	<b>61</b>	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 <sup>2</sup> IFU/mL)
1225402	<b>Ø</b>	<b>62</b>	<i>Chlamydia trachomatis D</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> IFU/mL)
1225403	<b>Ø</b>	<b>62</b>	<i>Escherichia coli</i> K12
1225404	<b>++</b>	<b>61</b>	<i>Chlamydia pneumoniae</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> IFU/mL)

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

<i>n = 93</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>					<i>Inhibition</i>			
	<b>1225401</b>	<b>1225402</b>	<b>1225403</b>	<b>1225404</b>		<b>1225401</b>	<b>1225402</b>	<b>1225403</b>	<b>1225404</b>
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	<b>78</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>90</b>	n.d.	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>Negativ</b>	<b>14</b> <sup>1)</sup>	<b>91</b>	<b>91</b>	<b>3</b>	nein <i>no</i>	<b>93</b>	<b>93</b>	<b>93</b>	<b>93</b>
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	<b>1</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	ja <i>yes</i>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>LightMix <i>C.pneumoniae</i> [21] (n =14)</b>	<b>27</b>	27 / 28	<b>96</b>	<b>28</b>	28 / 28	<b>100</b>
<b>Other commercial tests [27] (n = 32)</b>	<b>58</b>	58 / 64	<b>91</b>	<b>64</b>	64 / 64	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 45)</b>	<b>79</b>	79 / 89 <sup>§</sup>	<b>89</b>	<b>86</b>	86 / 90	<b>96</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n=2)</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>

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

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample #1225401 contained a very low number of *Chlamydia pneumoniae* target organisms, negative PCR results were not rated as “false negative”, but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

**PCR-/NAT *Mycoplasma pneumoniae***  
**(RV 541) November 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225411	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225412	++	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>5</sup> genome copies/mL)
1225413	∅	62	<i>Ureaplasma urealyticum</i> (~ 10 <sup>4</sup> genome copies/mL)
1225414	+	61	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> (~ 10 <sup>4</sup> genome copies/mL)

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

<i>n</i> = 99	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
Befund <i>Result</i>	1225411	1225412	1225413	1225414	1225411	1225412	1225413	1225414	
Positiv	1	97	5	96	n.d.	0	0	0	0
Negativ	98	2	93	3	nein <i>no</i>	99	99	99	99
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	1	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

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

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

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
LightMix <i>M.pneumoniae</i> [20] (n = 13)	26	26 / 26	100	26	26 / 26	100
Qiagen <i>M.pneumoniae</i> [21] (n = 3)	6	6 / 6	100	6	4 / 6	100
Minerva Venor Mp [22] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	100
Commercial assay / kit [27] (n = 32)	62	62 / 64	97	60	60 / 64	94
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 48)	93	93 / 96	97	93	93 / 95 <sup>§</sup>	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	4	4 / 4	100

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

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225421	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225422	+++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> genome copies/mL)
1225423	++	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> genome copies/mL)
1225424	(+)	61	<i>Coxiella burnetii</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> genome copies/mL)

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

<i>n = 20</i>	<i>Probennummer (Sample no.)</i>				<i>Inhibition</i>				
<i>Befund Result</i>	1225421	1225422	1225423	1225424	1225421	1225422	1225423	1225424	
<b>Positiv</b>	0	20	20	16	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	20	0	0	3 <sup>1)</sup>	nein no	20	20	20	20
<b>Fraglich Questionable</b>	0	0	0	1	ja yes	0	0	0	0

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>LightMix <i>C. burnetii</i> [20] (n = 2)</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 18)</b>	<b>50</b>	50 / 53 <sup>§</sup>	<b>94</b>	<b>18</b>	18 / 18	<b>100</b>

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

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample #1225424 contained a very low number of *Coxiella burnetii* target organisms, negative PCR results were not rated as “false negative”, but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.

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



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225431	<b>+</b>	<b>61</b>	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
1225432	<b>++</b>	<b>61</b>	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
1225433	<b>+++</b>	<b>61</b>	<i>Francisella tularensis holarctica</i> (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
1225434	<b>∅</b>	<b>62</b>	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n</i> = 11	<b>Probennummer (Sample no.)</b>				<b>Inhibition</b>				
<b>Befund Result</b>	<b>1225431</b>	<b>1225432</b>	<b>1225433</b>	<b>1225434</b>	<b>1225431</b>	<b>1225432</b>	<b>1225433</b>	<b>1225434</b>	
<b>Positiv</b>	11	11	11	0	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	0	0	0	11	nein no	11	11	11	11
<b>Fraglich Questionable</b>	0	0	0	0	ja yes	0	0	0	0

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

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

<b>NAT-Methode</b> [Code] (total number *)	<b>NAT richtig positiv</b> <i>True positive results</i>			<b>NAT richtig negativ</b> <i>True negative results</i>		
	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>	<b>Absolut</b> <i>Absolute</i>	<b>Relativ</b> <i>Relative</i>	<b>%</b>
<b>LightMix <i>F.tularensis</i> [20] (n = 3)</b>	<b>9</b>	9 / 9	<b>100</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>
<b>Commercial assay / kit [27] (n = 1)</b>	<b>3</b>	3 / 3	<b>100</b>	<b>1</b>	1 / 1	<b>100</b>
<b>In house PCR assay [28] (n = 8)</b>	<b>24</b>	24 / 24	<b>100</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>

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

**PCR-/NAT *Pneumocystis jirovecii*  
 (RV 560) November 2012**



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

	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
1225601	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
1225602	++	61	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (~ 1x10 <sup>5</sup> genome copies/mL)
1225603	(+)	61	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (~ 1x10 <sup>3</sup> genome copies/mL)
1225604	+	61	<i>Pneumocystis jirovecii</i> (~ 1x10 <sup>4</sup> genome copies/mL)

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

<i>n</i> = 36	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	1225601	1225602	1225603	1225604	1225601	1225602	1225603	1225604	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	0	36	29	34	n.d.	0	0	0	0
<b>Negativ</b>	36	0	7 <sup>1)</sup>	2	nein <i>no</i>	36	36	36	36
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

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

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

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 / kit [26] (n =16)	45	45 / 48	94	16	16 / 16	100
In house PCR assay [27] (n = 19)	51	51 / 57	89	19	19 / 19	100
Andere / k.A. / other [28] (n = 1)	3	3 / 3	100	1	1 / 1	100

**Comments:** <sup>1)</sup> As sample #1225603 contained a very low number of *Pneumocystis jirovecii* DNA, negative PCR results were not rated as “false negative”, but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.