



An die Teilnehmer
des INSTAND-Ringversuchs
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter in English on page 9 of this document.

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

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

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

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

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

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2004) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir nach wie vor für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. Hans Wolf

Prof. Dr. Norbert Lehn

Prof. Dr. Eberhard Straube

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2004:

Nachdem in der vorhergegangenen Runde (November 2003) dieser neuen Ringversuchs-Serie einige Proben mit relativ geringer Keimzahl versandt wurden, wollten wir bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) den Versand von Proben mit relativ niedriger Keimzahl vermeiden. Es sei aber an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß noch zahlreiche Rückstell-Probensätze des letzten Ringversuchs verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets enthalten unter anderem als "grenzwertig positiv" zu bezeichnende Proben für *B. pertussis* (Probe # 32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe # 32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702) und können im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung beispielsweise als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

Bei den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen jedoch wieder deutlich über der "durchschnittlichen Nachweisgrenze" eingestellt, die wie folgt definiert wird: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Falsch-negative Ergebnisse stellen in der aktuellen Ringversuchsrunde damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar. Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen 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. 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. Eine weitergehende Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen erschien bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch systematisch erfasst und bleiben für retrospektive Analysen verfügbar. Erwartungsgemäß waren auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs 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 anonymisierten Ergebnisse der einzelnen Sollwertlaboratorien oder die Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR) auch unter folgender Internetadresse:
"www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)"
als *pdf*-Files zum freien download bereit.

RV 435: *Borrelia burgdorferi*

Ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik sind nach wie vor die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *Borrelia* Genotypen, die, zumindest außerhalb den Vereinigten Staaten von Amerika, mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden. Diese Situation spiegelt sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Wie bereits bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden praktiziert, so wurden auch diesmal bei der Konzeption der 4 Einzelproben nicht nur Verdünnungen von "Prototyp"-Isolaten von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto angefertigt, sondern auch einer der in Europa häufig beobachteten Stämme von *Borrelia garinii* versandt. Diese *Borrelia*-Spezies ist bekanntermaßen von hoher pathogener Relevanz und unterscheidet sich auf Nukleinsäureebene innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene in gewissem Umfang von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Probe # 41502 enthielt eine relativ hohe Menge an *Borrelia garinii*, die von 61 der insgesamt 63 Teilnehmer als positiv getestet wurde. Probe # 41503 enthielt diesmal eine (im Vergleich zu typischem klinischen Probenmaterial) doch noch recht ansehnliche Menge an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto - die von dem Großteil der teilnehmenden Laboratorien zuverlässig und eindeutig nachzuweisen war. Lediglich 2 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Einer dieser Teilnehmer verwendete ein Real-time PCR Protokoll mit interner Kontrolle und *OspA* als spezifische Zielsequenz, der andere Teilnehmer gab die Verwendung eines nested Block-Cycler PCR-Protokolls mit anschließender Agarosegel-Elektrophorese und das Flagellin-Gen als Zielsequenz an.

Bis auf 9 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet und eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde dabei von keinem dieser Teilnehmer beobachtet.

Die insgesamt 4 falsch-positiven Ergebnisse lassen sich wohl am ehesten mit Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung oder im Fall der Probe # 41501 (*Treponema phagedenis*; 2 falsch-positive Ergebnisse) auch mit mangelnder Spezifität der eingesetzten Testsysteme erklären.

Aufgrund der geringen Anzahl von "kommerziellen Testsystemen" im Teilnehmerfeld lassen sich auch im Rahmen dieses Ringversuchs derzeit noch keine seriösen Vergleiche zwischen kommerziellen und selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Da in den letzten Monaten von einigen Firmen die Entwicklung und Vermarktung von diagnostischen PCR-Systemen für Borrelien-DNA angekündigt wurde, könnte sich diese Situation in absehbarer Zeit etwas ändern. Für die nächsten Ringversuchsrunden ist daher schon ein etwas höherer Anteil von Teilnehmern mit kommerziellen Testsystemen zu erwarten.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
(RV 435) April 2004**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
41501	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i> (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
41502	+++	61	<i>Borrelia garinii</i> (OspA-Typ 4) (~ 5x10 ⁶ organisms/mL)
41503	++	61	<i>B. burgdorferi sensu stricto</i> (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
41504	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 63	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	41501	41502	41503	41504		41501	41502	41503	41504
Befund Result									
Positiv	2 ²⁾	61	61	2 ²⁾	n.d.	2	2	2	2
Negativ	61	2 ¹⁾	2 ¹⁾	61	nein no	61	61	61	61
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	0	0	0	0

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

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

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	%
In house PCR assay [28] (n = 54)	104 ¹⁾	104 / 108	96	104 ²⁾	104 / 108	96
Other/commercial tests [27] (n = 9)	18	18 / 18	100	18	18 / 18	100

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

- Comments:**
- ¹⁾ One participant reported 2 false-negative PCR results for samples # 41502 & 41503. Here the use of a *real-time* PCR with internal control and *OspA* as target sequence was indicated.
 - ²⁾ One participant reported 2 false-positive PCR results for samples # 41501 & 41504. Here the use of a Block Cycler PCR protocol with agarose gel electrophoresis and a ribosomal gene as target sequence was indicated.

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438)

Dear Participant, dear Colleague,

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

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

This highly desired program for external validation was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. As you can learn from "www.instand-ev.de", this new segment of their huge proficiency testing program is now open for diagnostic laboratories worldwide. We are aiming at two validation rounds per year (April / September), a reasonable price around \$ 150 per set of 4 samples, 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 of proficiency testing. But 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 on this proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)" can be downloaded in form of pdf-files at "www.udo-reischl.de", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style.

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

Yours sincerely,



Udo Reischl



435 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2004

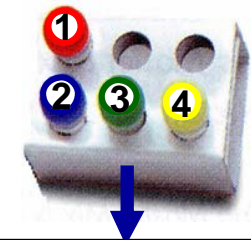
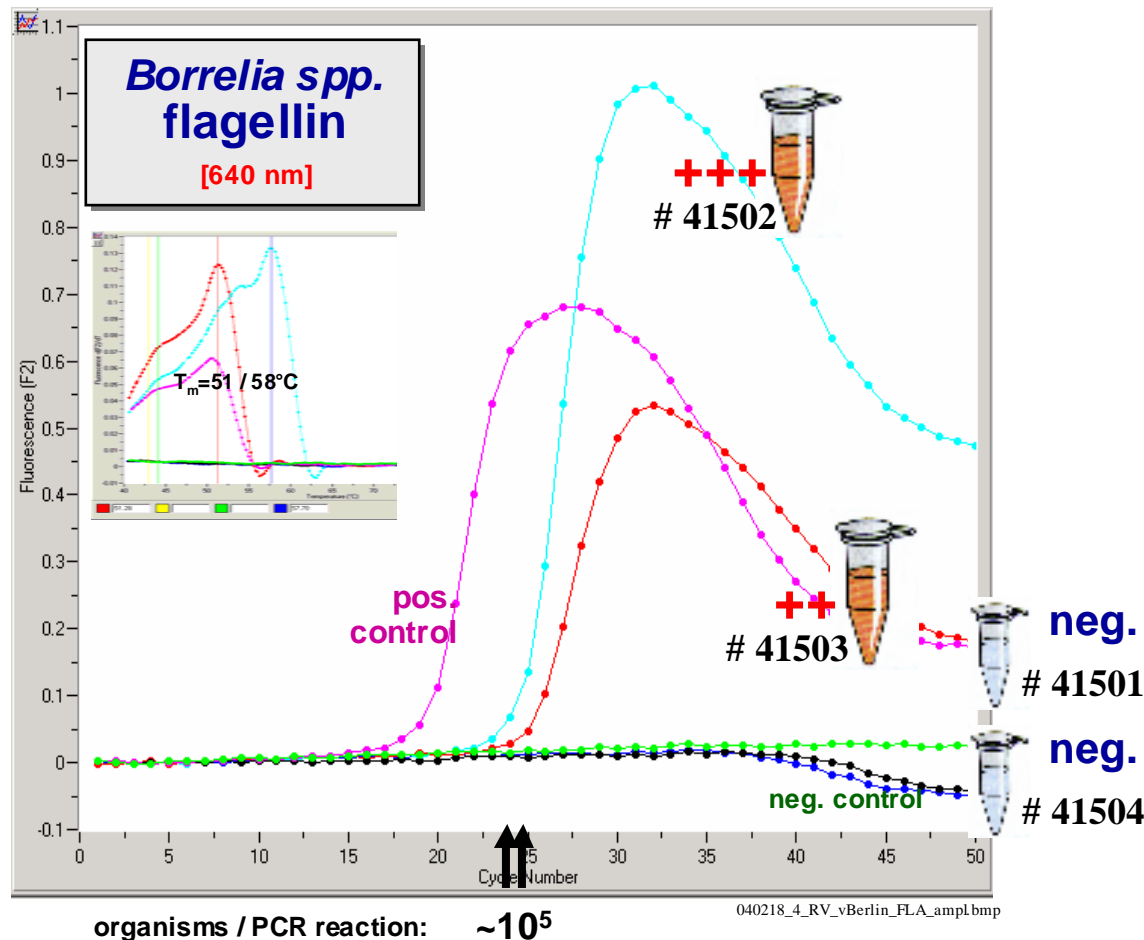
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

- | | | |
|---|---------------|-------|
| 1 | Bobu 41501 | |
| 2 | Bobu 41502 | 23.99 |
| 3 | Bobu 41503 | 24.68 |
| 4 | Bobu 41504 | |
| 5 | poKo Bobu/FLA | 18.76 |
| 6 | negKo | |



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house PCR protocol..



➤ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 μL of PCR-grade water.

➤ Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.

➤ Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMM/02.2004

Regensburg





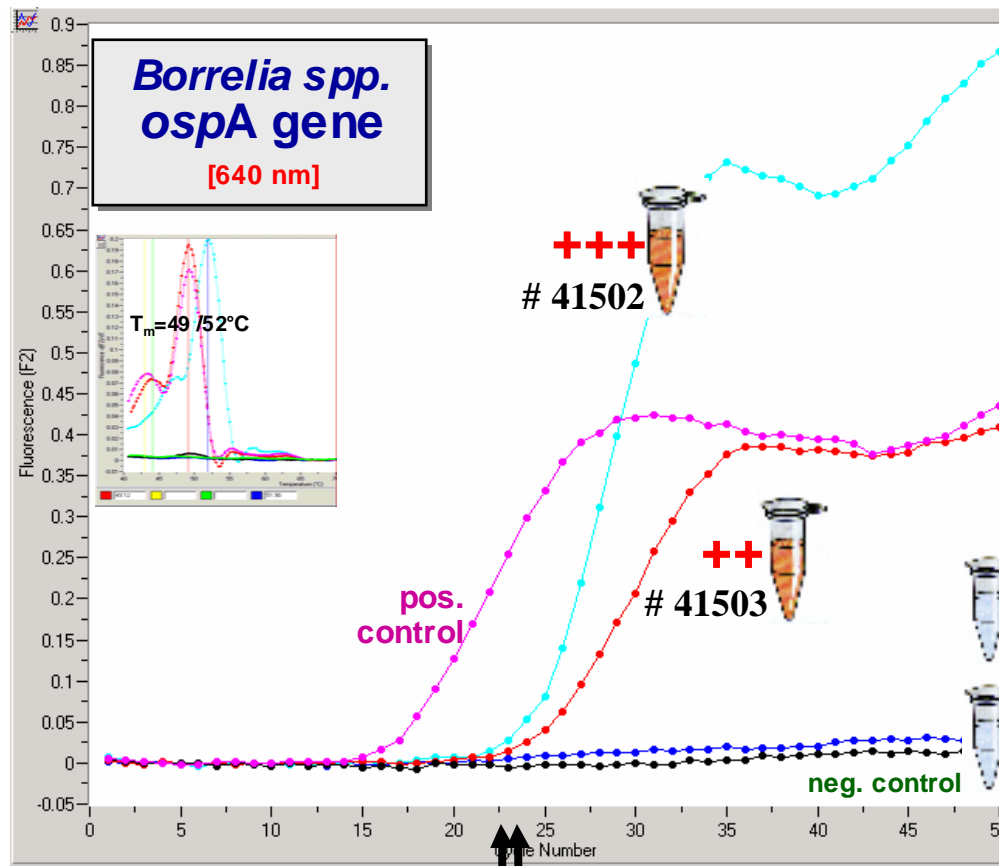
435 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2004

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

- 7 Bobu 41501
- 8 Bobu 41502 24.88
- 9 Bobu 41503 25.35
- 10 Bobu 41504
- 11 poKo Bobu/OSPA 17.13
- 12 negKo

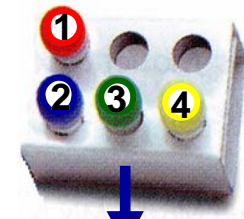


organisms / PCR reaction: ~10⁵

040218_4_RV_vBerlin_ospA_ampl.bmp



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house PCR protocol..



➤ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.

➤ Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.

➤ Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

neg.
 # 41501
 neg.
 # 41504

U. Reischl/RIMMH/02.2004

