



**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 541)**

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find **a brief discussion of the current results in English** after the section in German language. As always, result tables are depicted in a bilingual style.*

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

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

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

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

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

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

Sowohl im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms als auch bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Bis auf wenige Ausnahmen waren die bisherigen Kommentare jedoch durchwegs positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. H. Wolf, Prof. Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

MAI 2009:

Highlights der aktuellen Ringversuchsrunde waren zweifelsohne der RV 531 (*Chlamydia trachomatis*), der diesmal auch ein Isolat der viel diskutierten **schwedischen C. trachomatis Mutante** enthielt, sowie der RV 539 (MRSA), bei dem ein "heimisches" **MRSA-Isolat mit ungewöhnlicher SCCmec Integrationsstelle** versandt wurde. Aber dazu später mehr.

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: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 91001), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 91502, # 91503), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 91414), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 91424). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 91104 dieser Ringversuchsrunde. Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

Mit Ausnahme der zuvor erwähnten "grenzwertig positiven" Einzelproben wurden die Mengen der entsprechenden Zielorganismen in den Probensätzen der aktuellen Ringversuchsrunde wieder relativ deutlich über der Nachweisgrenze von "durchschnittlich sensitiven PCR/NAT-Testkonzepten" eingestellt. Diese definieren wir wie folgt: als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt das 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; gut evaluierte Primersequenzen).

Bei den meisten Probenmaterialien der aktuellen Ringversuchsrunde stellen falsch-negative Ergebnisse damit einen deutlichen Hinweis auf ernstzunehmende Mängel innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation und Detektion dar.

Falsch-positive Ergebnisse sind dagegen in der Regel als Hinweis auf eine Kreuzkontamination während der Probenextraktion und -abarbeitung und/oder auf mangelnde Spezifität der eingesetzten Testsysteme zu betrachten.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tabelle 1 zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in Tabelle 3 nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum

"Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden. Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich erneut bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

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 *Borrelia* 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. Wie bereits bei den vorhergegangenen Probenpanels praktiziert, so wurden diesmal bei der Konzeption der 4 Einzelproben keine definierten Suspensionen des amerikanischen "Prototyp"-Isolates von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto angefertigt, sondern auch zwei in Europa vorkommende Genospezies der *B. burgdorferi* sensu lato Gruppe versandt.

Die Proben # 91502 und # 91504 enthielten diesmal eine Mischung von *Borrelia afzelii* und *Borrelia valaisiana* (jeweils $\sim 5 \times 10^3$ Organismen/mL). Erfreulicherweise wurde diese Probe von 105 bzw. 106 der insgesamt 111 Teilnehmer als richtig positiv befundet und falsch negative Ergebnisse waren hier eher die Ausnahme. Diese beiden *Borrelia*-Spezies unterscheiden sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene in gewissem Umfang von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto - sie sollten aber von diagnostischen Testsystemen mit vergleichbarer Sensitivität erfasst werden. Diese Anforderung wurde offensichtlich weitgehend erfüllt. Wie im Rahmen dieser Ringversuchsreihe bereits mehrfach erwähnt, ist *Borrelia garinii* (neben *B. afzelii*) in unseren Breiten die wohl am weitesten verbreitete Spezies mit bekanntermaßen pathogener Relevanz.

Probe # 91503 enthielt mit $\sim 1 \times 10^4$ Organismen pro mL diesmal eine signifikante Menge an *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, deren DNA von 109 der 111 Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Einer der beiden Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 91503 verwendeten dabei ein TaqMan *real-time* PCR Protokoll und das Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz, und der andere Teilnehmer gab hier die Verwendung eines *nested* Block-Cycler PCR-Protokolls zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte an.

Die "negative" Probe # 91501, die lediglich *E. coli* enthielt, wurde auch diesmal wieder von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet. Lediglich bei 2 Teilnehmern hatten hier offensichtlich Kontaminationsereignisse während der individuellen Probenaufarbeitung stattgefunden oder es wurden Testsysteme mit mangelhafter Spezifität eingesetzt.

Kommentar von Dr. Volker Fingerle und PD Dr. Andreas Sing (Nationales Referenzzentrum für Borrelien am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit). Im vorliegenden Ringversuch waren auch Mischungen verschiedener *B. burgdorferi* s.l. Spezies enthalten. Mittlerweile sind 5 verschiedene humanpathogene *B. burgdorferi* s.l. Spezies, die alle in Deutschland vorkommen, bekannt: *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* und seit kurzem auch *B. bavariensis*. Letztgenannte Spezies entspricht dem bisherigen *B. garinii* OspA Typ 4, der auf Grund deutlicher genetischer wie auch ökologischer Unterschiede als neue Spezies reklassifiziert wurde. Interessanterweise konnten sowohl im Vektor Zecke als auch in Proben von an Lyme-Borreliose Erkrankten Mischinfektionen mit verschiedenen *B. burgdorferi* s.l. Spezies nachgewiesen werden. Nachdem bislang keine relevanten Unterschiede in der Empfindlichkeit gegenüber den zur Therapie empfohlenen Antibiotika bestehen, ist die Unterscheidung verschiedener *B. burgdorferi* s.l. Spezies aus klinischem Material insbesondere für die Forschung interessant. Da aber die Untersuchung von vom Menschen entfernten Zecken, um daraus eine Therapieindikation abzuleiten, als IGeL-Leistung weit verbreitet ist, ist speziell bei dieser Untersuchung fraglos die nachgewiesene *B. burgdorferi* s.l. Spezies zu identifizieren und, mit einem entsprechenden Hinweis bzgl. der Humanpathogenität versehen, im Befund anzugeben. Es ist nicht akzeptabel wenn in Befunden zu vom Menschen entfernten Zecken lediglich „*Borrelia*

burgdorferi s.l. nachgewiesen“ angegeben wird. In der Praxis werden basierend auf solchen Befunden oft wochenlang Antibiotika verabreicht. Mischinfektionen sind dann von besonderem Interesse: Ist die PCR in der Lage, verschiedene Spezies zu detektieren? Wie ist das Ergebnis bei unterschiedlichen Mischungsverhältnissen? Wird zumindest die humanpathogene Spezies identifiziert? U.a. Es wäre deshalb auch für die Zukunft wünschenswert, wenn für die Ringversuche die Angabe der nachgewiesenen Spezies in die Bewertung einfließen würde.

Auch diesmal hatten wieder über die Hälfte der Teilnehmer selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde im Rahmen dieser Ringversuchsrunde dabei von keinem 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. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (4x), TIB Molbiol LightMix *Borrelia* (3x), Amodia GenFlow *Borrelia* Plus (1x) und Eligene *Borrelia* RT (3x).

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

As this proficiency testing panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples do not exclusively contain suspensions of "prototype" isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto - and also other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies may be present in individual samples. The current set of QC samples contained two samples with almost equal amounts of *Borrelia afzelii* and *Borrelia valaisiana* (samples # 91502 and # 91504; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL), and one sample with *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (sample # 91503; $\sim 1 \times 10^4$ organisms/mL). With the exception of 9 false-negative results for samples # 91503 and # 91504 and 2 false-negative results for sample # 91503, the *B. burgdorferi*-specific assays of the participants worked well. Two of the 111 participants reported a false-positive result for the "negative" sample # 91501 (which contained only non-infected human cells and *Escherichia coli*). The latter is presumably due to some intralaboratory cross-contamination events.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 535) Mai 2009**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91501	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
91502	+	61	<i>Borrelia afzelii</i> + <i>Borrelia valaisiana</i> , PKO + VS116 (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
91503	+	61	<i>Borrelia burgdorferi sensu stricto</i> , PKa II (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
91504	+	61	<i>Borrelia afzelii</i> + <i>Borrelia valaisiana</i> , PKO + VS116 (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)

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

n = 111	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	91501	91502	91503	91504	91501	91502	91503	91504	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	2	105	109	106	n.d.	2	2	2	2
Negativ	108	5	2	4	nein <i>no</i>	109	109	109	109
Fraglich <i>Questionable</i>	1	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.

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 15)	42	42 / 45	93	15	15 / 15	100
Demeditec GenFlow [21] (n = 6)	17	17 / 18	94	6	6 / 6	100
Other/commercial tests [27] (n = 26)	77	77 / 78	99	24	24 / 25 [§]	96
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 62)	179	179 / 184 [§]	97	61	61 / 62	98
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	5	5 / 6	83	2	2 / 2	100

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



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi* status 05.2009

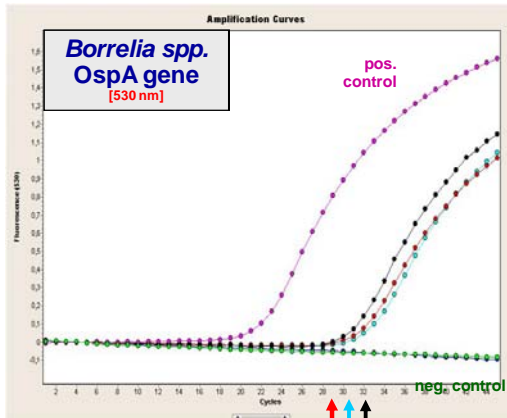
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

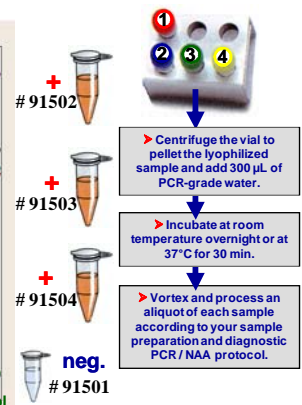
✓	1	91501	
✓	2	91502	31,47
✓	3	91503	30,69
✓	4	91504	29,76
✓	5	pos. Control OspA TM	21,04
✓	6	NTC	



LightCycler Taqman PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction: ~10² 090303_7_RV_Borrelia_TM_amp.jpg



INSTAND-E03_V09



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi* status 05.2009

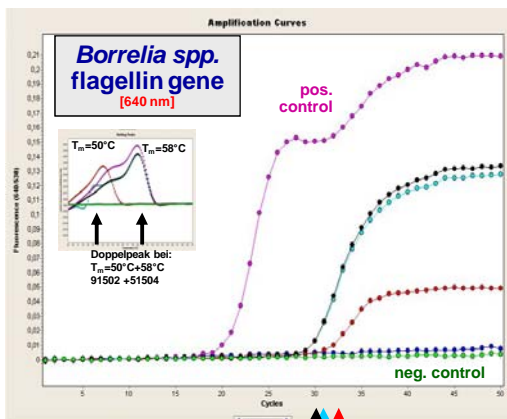
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

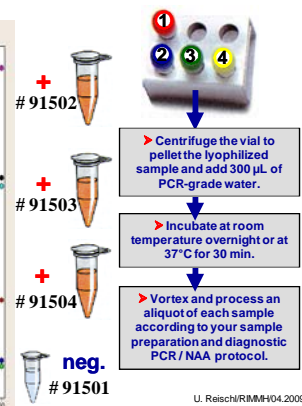
✓	1	91501	
✓	2	91502	28,28
✓	3	91503	29,76
✓	4	91504	28,32
✓	5	pos. Control Flagellin	19,32
✓	6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction: ~10² 090303_7_RV_Borrelia_FLA_amp.jpg



INSTAND-E04_V09



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 05.2009

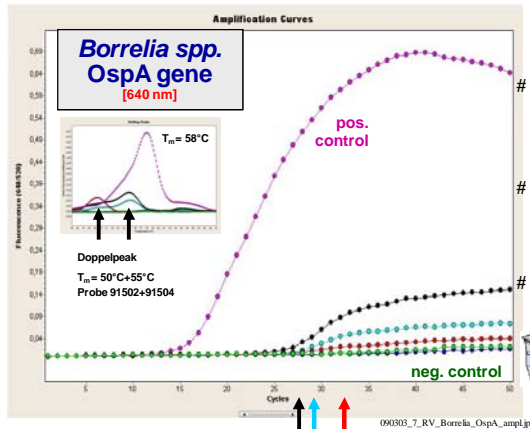
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

✓	7	91501	30,90
✓	8	91502	37,03
✓	9	91503	29,89
✓	10	91504	17,47
✓	11	pos. Control OspA	
✓	12	NTC	

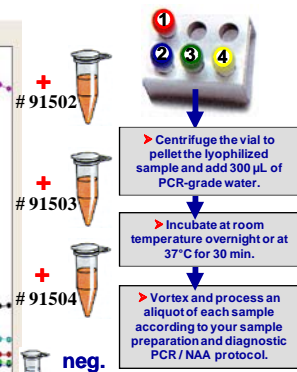


LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction:

~10²



U. Reischl/RIMM/H04.2009



INSTAND-E05_V09



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg
<http://www.udo-reischl.de>

Instand e.V.
 Institut für Standardisierung und Dokumentation
 im medizinischen Laboratorium e.V.
<http://www.instand-ev.de>



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 05.2009

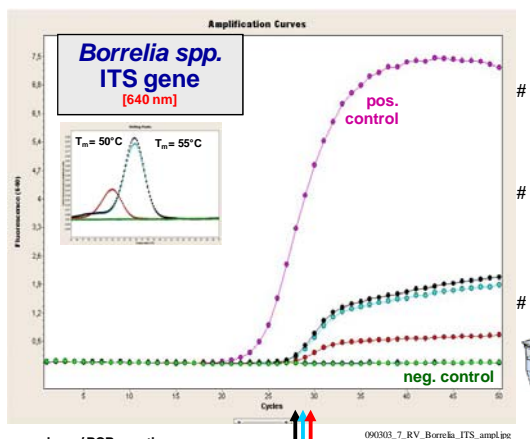
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

✓	13	91501	26,09
✓	14	91502	26,17
✓	15	91503	25,97
✓	16	91504	23,19
✓	17	pos. Control ITS	
✓	18	NTC	

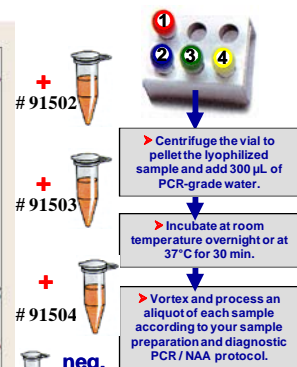


LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction:

~10²



U. Reischl/RIMM/H04.2009



INSTAND-E06_V09