



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

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 of this document. As always, result tables are depicted in a bilingual style.*

**Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,**

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

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

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

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

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

Sowohl im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms als auch bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**PD Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle**

June 8, 2010

To the participants of the  
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)  
for NAATs in Diagnostic Bacteriology  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 541)

**Dear Participant, dear Colleague,**

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

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

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

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

Further information as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our quality control and proficiency test program "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT) can be downloaded in form of pdf-files at "[www.udo-reischl.de](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,



**PD Dr. Udo Reischl**

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

**Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

**Übrigens:** das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter [www.remmdi.de](http://www.remmdi.de)

### APRIL 2010:

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

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 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 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.instandev.de](http://www.instandev.de)) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

## RV 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. Diesmal wurde jedoch, wie auch bereits bei einem der vorhergegangenen Probenpanels mit *B. burgdorferi* sensu stricto praktiziert, bei der Konzeption der 4 Einzelproben eine Art Verdünnungsreihe von *B. afzelii* angefertigt und an die Teilnehmer versandt.

Diese *Borrelia*-Spezies unterscheidet sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene, in gewissem Umfang von anderen Spezies innerhalb der *B. burgdorferi* s.l. Gruppe. Neben *B. garinii*, *B. burgdorferi* sensu stricto und *B. bavariensis* ist *B. afzelii* in unseren Breiten die wohl am weitesten verbreitete Spezies mit bekanntermaßen humanpathogener Relevanz.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben enthielt somit eine Probe mit einer relativ hohen Menge an *B. afzelii* PKo (# 1015353,  $\sim 10^6$  Organismen/mL), eine Probe mit etwa hundertfach geringerer Menge (# 1015351,  $\sim 10^4$  Organismen/mL), eine Probe mit etwa tausendfach geringerer Menge an *B. afzelii* PKo (# 1015352,  $\sim 10^3$  Organismen/mL) sowie eine Probe ohne Zielorganismen (# 1015354), die ausschließlich *E. coli* und humanes Zellmaterial enthielt.

Die relativ stark positive Probe # 1015353 wurde diesmal von 100 der insgesamt 101 Teilnehmer als positiv befundet. Probe # 1015351 enthielt mit ca.  $10^4$  Organismen pro mL eine etwa hundertfach geringere Menge an *B. afzelii*, deren DNA immerhin noch von 98 Teilnehmern mit ihren jeweiligen Borrelien-spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte.

Zwei der 3 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 1015351 verwendeten dabei ein TaqMan *real-time* PCR Protokoll und das Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz und einmal wurde 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 angeführt.

Mit ca.  $10^3$  *B. afzelii* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 1015352 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 92 der insgesamt 101 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet. Ähnlich wie bei der Probe mit ca.  $10^3$  CFU/mL an *B. burgdorferi* sensu stricto des vorhergehenden Ringversuchs (November 2009) und einer der 4 Proben mit ca.  $10^3$  CFU/mL an *B. afzelii* im Ringversuch April 2008 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 Analysesysteme für den Nachweis von Borrelien DNA mit einer Menge von ca.  $10^3$  Organismen/mL Probenmaterial erreicht zu sein scheint. **Anmerkung des Ringversuchsleiters:** bei einer DNA-Aufreinigung aus 100 µl Probenmaterial, einer Elution in 100 µl (also ca. 100 Genomkopien in 100 µl) und der Verwendung von 5 µl 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 5 bis 10 Kopien pro Bakteriengenom vor).

Aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen in Probe # 1015352 wurden die mitgeteilten Ergebnisse diesmal nicht in die Bewertung für die Zertifikate mit einbezogen. Dies ist auch durch die beiden grau schraffierten Felder in Tabelle 2 gekennzeichnet. Ringversuchsteilnehmer, die diese Probe als "negativ" bewertet haben, sollten dies dennoch zum Anlaß nehmen, die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen

Testsysteme zu überprüfen oder sich gegebenenfalls deren technische Limitationen bewußt machen.

Die "negative" Probe # 1015354, die anstelle der Zielorganismen diesmal eine nennenswerte Menge an *E. coli* Zellen und *Treponema phagedenis* enthielt, wurde hier auch wieder von einem erfreulich hohen Anteil der Teilnehmer als negativ befundet. Lediglich bei einem der insgesamt 101 Teilnehmer hatten hier offensichtlich Kontaminationsereignisse während der individuellen Probenaufarbeitung stattgefunden oder es wurden Testsysteme mit mangelhafter Spezifität eingesetzt.

Über die Hälfte der Teilnehmer haben selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde im Rahmen dieser Ringversuchsrunde dabei lediglich von einem der Teilnehmer bei einer Einzelprobe beobachtet. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen zu beobachten. Im Gegensatz zum "RealArt Borrelia" Testsystem, das mittlerweile mit dem Testcode [20] auf dem Ergebnisformular spezifiziert werden kann und das diesmal von 13 Teilnehmern erfolgreich auch zum Nachweis der relativ geringen Menge an *B. afzelii* in Probe # 1015352 eingesetzt wurde, zeigte das Demeditec GenFlow Testsystem (Code[21]) speziell bei der letztgenannten Probe eine etwas schlechtere Performance. Darüberhinaus wurde im Kommentarfeld des Ergebnisformulars unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: TIB Molbiol LightMix Borrelia (4x), GeneProof *Borrelia burgdorferi* PCR Kit (3x), EliGene Borrelia LC PCR (3x), Attomol *Borrelia burgdorferi* DNS-LINA (2x), Demeditec GenFlow Borrelia Plus (1x), und Qiagen artus Borrelia LC PCR Kit (1x).

**Kommentar zum aktuellen Borrelien-PCR Ringversuch von Dr. Volker Fingerle und PD Dr. Andreas Sing** (Nationales Referenzzentrum für Borrelien und Konsiliarlabor für Ehrlichien am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit; Sollwertlabor für INSTAND e.V. Ringversuch RV 535). Das Ergebnis des aktuellen Ringversuchs zum molekulargenetischen Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. zeigt eine erfreulich hohe analytische Sensitivität für niedrige *B. afzelii* Konzentrationen sowohl der kommerziellen wie auch der *in-house* Testsysteme. Vergleichbare Ergebnisse wurden auch im Ringversuch 2008, damals mit knapp 90% Sensitivität für ebenfalls  $10^3$  Zielorganismen pro ml, erzielt. Bemerkenswert: In beiden Ringversuchen wurde *B. afzelii* Stamm PKo eingesetzt, der sicherlich eine weite Verbreitung in den Laboren hat. Demgegenüber hatten in einem Ringversuch mit *B. burgdorferi* sensu stricto weniger als 70% der Teilnehmer  $10^3$  Borrelien pro mL Untersuchungsprobe detektiert. Die wahrscheinlichste Ursache ist in der genetischen Heterogenität von *B. burgdorferi* s.l. zu sehen. Mittlerweile sind fünf humanpathogene Genospezies – *B. burgdorferi* s.s., *B. afzelii*, *B. garinii*, *B. spielmanii* und *B. Bavariensis* (ehemals *B. garinii* Ospa-Typ 4) – und drei möglicherweise humanpathogene Genospezies – *B. bissettii*, *B. valaisiana* und *B. lusitaniae* – identifiziert, die alle in Europa vorkommen. Selbst innerhalb einer Genospezies konnten z.T. erhebliche genetische Unterschiede gezeigt werden. Es ist deshalb nicht wirklich überraschend, wenn unterschiedliche Sensitivitäten einzelner Testsysteme für verschiedene Genospezies bestehen. Wir möchten deshalb dringend empfehlen (soweit noch nicht geschehen), die analytische Sensitivität der Testsysteme bezogen auf alle relevanten *B. burgdorferi* Genospezies zu bestimmen.

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

## **ENGLISCH:**

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

Due to numerous requests in the past few months, here is a short note for our participants outside Europe: as this proficiency testing panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples **do not necessarily** contain suspensions of "prototype" isolates of *B. burgdorferi* sensu 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 set of QC samples contained a kind of dilution series of *Borrelia afzelii* organisms in the sample matrix: sample # 1015353 contained about  $10^6$  organisms/mL, sample # 1015351 about  $10^4$  organisms/mL and sample # 1015352 about  $10^3$  organisms/mL of a *Borrelia afzelii* strain. A relatively high amount of *Borrelia afzelii* ( $\sim 1 \times 10^5$  organisms/mL) was present in sample # 1015353, which consequently was tested positive by 100 of the 101 participating laboratories. Sample # 1015351 contained approximately  $10^4$  *B. afzelii* organisms per mL and was tested "positive" by 98 participants. The 3 participants (who missed this particular sample) should consider to improve the analytical sensitivity and/or check the species coverage of their individual assay concepts. Sample # 1015352, which contained a relatively small amount of *B. afzelii* target organisms ( $\sim 10^3$  organisms per mL), was reported "positive" by 92 participants and "questionable" by one of the participating laboratories. Since the bacterial load was relatively low, we have not scored a (false) negative result for the latter sample in the course of issuing the corresponding QC certificates. Sample # 1015354 of the current set contained no target organisms but only non-infected human cells and *E. coli* cells. Only one participant reported a "questionable" result for this negative sample (presumably due to some intralaboratory cross-contamination events). With the exception of the false-negative results observed with the weak-positive sample # 1015352 of the current QC round, the *B. burgdorferi*-specific assays of the participants worked well.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1015351	++	61	<i>Borrelia afzelii</i> , Pko (~ 1x10 <sup>4</sup> organisms/mL)
1015352	(+)	61	<i>Borrelia afzelii</i> , Pko (~ 1x10 <sup>3</sup> organisms/mL)
1015353	+++	61	<i>Borrelia afzelii</i> , Pko (~ 1x10 <sup>6</sup> organisms/mL)
1015354	∅	62	<i>T. phagedenis</i> und <i>E. coli</i> K12

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

n = 101	Probennummer (Sample no.)				Inhibition
	1015351	1015352	1015353	1015354	
Befund Result					
Positiv	98	92	100	0	n.d.
Negativ	3	8 <sup>1)</sup>	1	100	nein no
Fraglich Questionable	0	1	0	1	ja yes

**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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 13)	39	39 / 39	100	13	13 / 13	100
Demeditec GenFlow [21] (n = 10)	27	27 / 30	90	10	10 / 10	100
Other/commercial tests [27] (n = 18)	52	52 / 53 <sup>§</sup>	98	18	18 / 18	100
In house PCR assay [28] (n = 58)	166	166 / 174	95	57	57 / 57 <sup>§</sup>	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	6	6 / 6	100	2	2 / 2	100

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

**Comments:** <sup>1)</sup> Eight of the 101 participants reported negative results for sample # 1015352. Due to the low number of target organisms we have not rated them as "false-negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.





## 535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2010

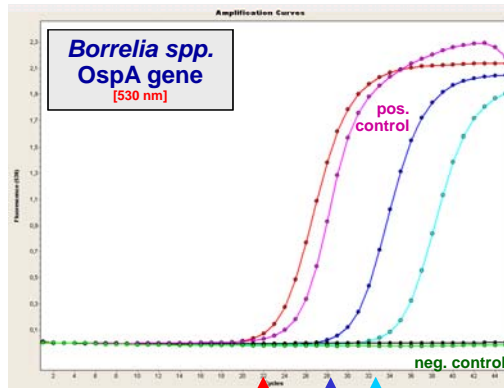
### ➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Fingerle

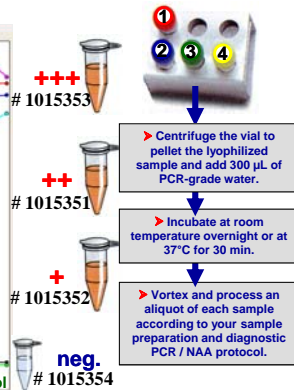
1	1015351	29,48
2	1015352	33,91
3	1015353	22,32
4	1015354	
5	Pos. Ko. <i>Borrelia</i> spp	23,99
6	NTC	



LightCycler Taqman PCR protocol:  
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction:  $\sim 10^4$   $\sim 10^2$   $\sim 10^1$



IN STAND-E03\_I/10



## 535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2010

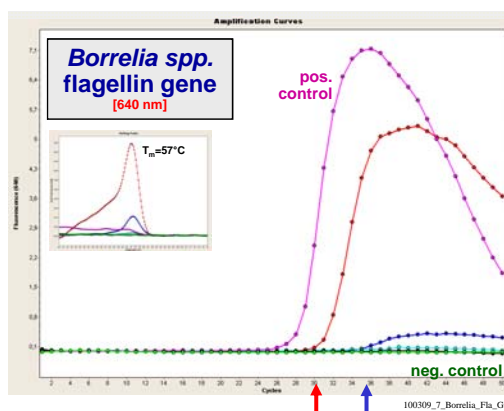
### ➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Fingerle

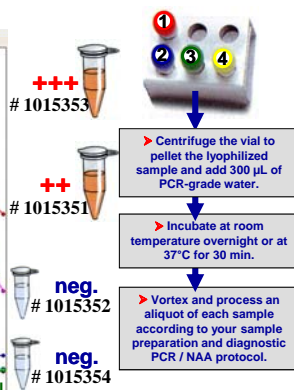
7	1015351	32,78
8	1015352	
9	1015353	29,68
10	1015354	
11	Pos. Ko. <i>Borrelia</i> Fla	26,71
12	NTC	



LightCycler PCR protocol:  
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction:  $\sim 10^4$   $\sim 10^2$



IN STAND-E04\_I/10



## 535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2010

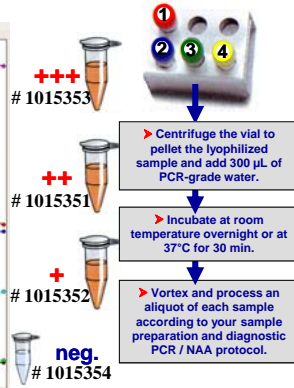
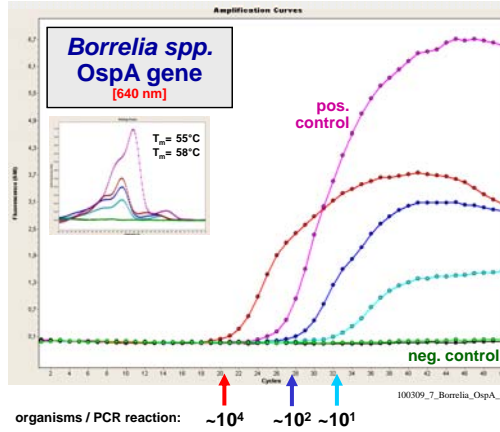
### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Fingerle

1	1015351	27,76
2	1015352	31,47
3	1015353	20,59
4	1015354	
5	Pos. Ko. <i>Borrelia</i> OspA	25,88
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:  
 unpublished in house protocol.



IN STAND-E05\_I/10



## 535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2010

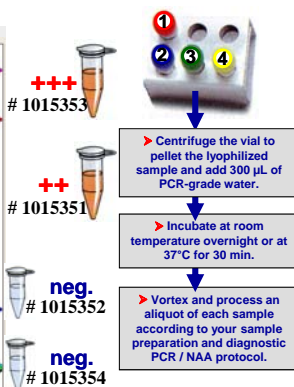
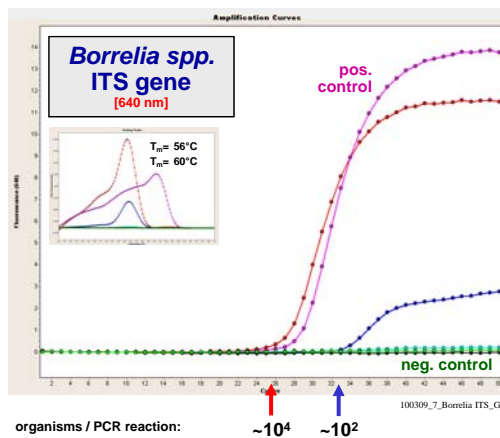
### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Fingerle

1	1015351	31,97
2	1015352	
3	1015353	26,26
4	1015354	
5	Pos. Ko. <i>Borrelia</i>	27,64
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:  
 unpublished in house protocol.



IN STAND-E06\_I/10