



Regensburg, den 5. Januar 2004

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 4 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 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 folgende Veröffentlichung aus der Zeitschrift "Der Mikrobiologe" verwiesen (Herausgeber: Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.):

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.

An dieser Stelle möchte ich mich, auch im Namen von INSTAND e.V., bei Ihnen noch einmal für die "Panne" bei der Aussendung der Ringversuchsproben entschuldigen. Bei den zukünftigen Ringversuchsrunden sollten Sie dann die Informationen zur Testdurchführung, die entsprechenden Listen mit den Code-Nummern und die Protokollbögen zur Auswertung in gewohnter Weise wieder zusammen mit dem Probenmaterial erhalten.

Bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir nach wie vor für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Auch wenn die Zahl der Anmeldungen im Vergleich zum vorherigen Ringversuch deutlich zugenommen hat, so "wachsen" Projekte wie diese erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter
Bakteriengenomnachweis

Prof. Dr. Hans Wolf

Prof. Dr. Norbert Lehn

Prof. Dr. Eberhard Straube

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

NOVEMBER 2003:

Nachdem die erste Runde dieser neuen Ringversuchs-Serie sehr erfolgreich verlaufen ist, wollten wir bei der Konzeption des zweiten Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) auch ein paar Proben mit relativ niedriger Keimzahl einschließen. Diese zum Teil sogar als "grenzwertig positiv" zu bezeichnenden Proben sollen aber lediglich orientierenden Charakter haben und wurden bei der endgültigen Ringversuchsauswertung zur Erteilung der Zertifikate nicht als "falsch negativ" bewertet. Als Richtwert für die Bewertung von Ringversuchsergebnissen gilt nach wie vor das 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Für *B. pertussis* (Probe #32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe #32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702) stehen aber jetzt standardisierte Probensets zur Verfügung, die zumindest im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung in gewisser Weise als wertvolle Sensitivitätsmarker dienen können. Bei Bedarf können Sie Rückstellproben dieser Probensets gerne über den Ringversuchsleiter nachbestellen (natürlich nur solange unser Vorrat reicht).

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 prozentualem 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 auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für den letzten, 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 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 dieses Ringversuchs zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Wie beim vorhergegangenen Ringversuch so wurden auch diesmal bei der Konzeption der einzelnen Ringversuchsproben absichtlich keine "Prototyp"-Isolate von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto ausgewählt, sondern vielmehr die in Europa häufig beobachteten Stämme von *Borrelia garinii* und *Borrelia valaisiana* versandt. Diese beiden *Borrelia* Spezies sind bekanntermaßen von hoher pathogener Relevanz und unterscheiden sich innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene auf Nukleinsäureebene in gewissem Umfang von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Probe #32501 enthielt eine relativ hohe Menge an *Borrelia valaisiana*, die von 38 der insgesamt 46 Teilnehmer als positiv getestet wurde. Probe #32503 enthielt diesmal eine relativ geringe Menge an *Borrelia garinii* (was hier in gewisser Weise die Situation bei der Untersuchung von einigen Arten klinischen Probenmaterials widerspiegelt) - die zumindest mit den PCR-Testsystemen von 35 der 46 Teilnehmer noch zuverlässig und eindeutig nachzuweisen war. Von einem Teilnehmer wurde das Ergebnis mit Probe #32503 als "fraglich" klassifiziert.

Bis auf 3 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 von keinem der Teilnehmer beobachtet.

Die insgesamt 6 falsch-positiven Ergebnisse lassen sich wohl am ehesten mit Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung oder im Fall der Probe #32502 (*Treponema phagedenis*; 4 falsch-positive Ergebnisse) auch mit mangelnder Spezifität der eingesetzten Testsysteme erklären.

Wie bereits bei der Auswertung des vorhergegangenen Ringversuchs ist auch hier vor allem die hohe Rate an falsch-negativen Ergebnissen für die relativ stark positive Probe #32501 (*Borrelia valaisiana*) auffällig. Die falsch-negativen Befunde sind hier wohl nur durch "Spezifitätslücken" bestimmter Testsysteme für einige der Genospezies innerhalb *Borrelia burgdorferi* sensu lato zu erklären und als echter diagnostischer Mangel zu betrachten. Bei den betroffenen Teilnehmern besteht daher gewisser Handlungsbedarf, denn eine effektive Menge an Zielorganismen von ca. 1×10^5 Erregeräquivalenten pro ml Probenmaterial liegt wohl noch deutlich über der Erregermenge, die in einigen klinischen Proben zu erwarten ist und dort auch sicher nachgewiesen werden sollte.

Hinsichtlich der für die PCR-Reaktion verwendeten Zielgene besteht auch diesmal offensichtlich kein Zusammenhang mit einer mangelhaften analytischen Sensitivität: 4 der 8 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für Probe #32501 verwendeten *ospA* und 2 Teilnehmer das Flagellin-Gen (*fla*) als Zielsequenz für ihr Borrelien-spezifisches *in house*-Testsystem.

Von den 10 Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis für Probe #32503 (die aufgrund der relativ geringen Menge an Zielorganismen im Probenmaterial bei der Erstellung der Ringversuchszertifikate von der Bewertung ausgenommen wurde) gaben 4 Teilnehmer die Verwendung des Flagellin-Gens, einer die Verwendung des *ospA* Gens und 3 Teilnehmer die Verwendung von "anderen" Zielsequenzen an.

Aufgrund der geringen Anzahl von "kommerziellen Testsystemen" im Teilnehmerfeld lassen sich auch im Rahmen dieses Ringversuchs keine seriösen Vergleiche zwischen kommerziellen und selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen.

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 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 / November), a reasonable price, 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).

With best personal regards,

Udo Reischl

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 435) November 2003**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
32501	++	61	<i>Borrelia valaisiana</i> (VS116) (~ 1x10 ⁵ organisms/mL)
32502	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i> (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
32503	+	61	<i>Borrelia garinii</i> (OspA-Typ 4) (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
32504	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 46	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	32501	32502	32503	32504		32501	32502	32503	32504
Befund <i>Result</i>									
Positiv	38	4	35	2	n.d.	2	2	2	2
Negativ	8	42	10	44	nein <i>no</i>	44	44	44	44
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	1	0	ja <i>yes</i>	0	0	0	0

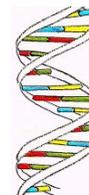
Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.

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>	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 42)	67	67 / 84	79	79	79 / 84	94
Other / commercial tests [27] (n = 3)	5	5 / 6	83	5	5 / 6	83

* 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 *Borrelia burgdorferi*
(RV 435) November 2003



***Borrelia burgdorferi*-Nachweis mittels PCR oder anderen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT)**

Ergebnisse der Sollwertlaboratorien

Results reported by our Reference Laboratories

Probenversand / shipment of samples: 12. November 2003

(results of the QC-program reference labs; listed but not depicted in alphabetical order):

- Professor Brade, Universität Frankfurt
- Professor Eiffert, Universität Göttingen
- Professor König, Universität Magdeburg
- Dr. Noordhoek, Laboratorium voor de Volksgezondheit, Leeuwarden, NL
- Professor Peters, Universität Münster
- Dr. Schoerner, Universität Erlangen-Nürnberg
- Professor Vogel, Universität Würzburg
- PD Dr. Wilske, Max von Pettenkofer Institut, München

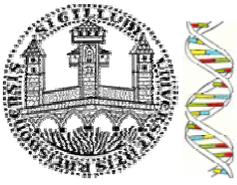
<i>Borrelia burgdorferi</i> (RV 435) Nov 2003	Erwartetes Ergebnis Expected Result	Labor 1	Labor 2	Labor 3	Labor 4	Labor 5	Labor 6	Labor 7	Labor 8
Anmerkungen*		[28],1	[28],7	[28],7	[27],9	[28],6	[28],8	[28],8	[28],1
32501	++^{a)}	+	+	+	+	-	+	-	+
32502	++^{b)}	-	-	-	-	-	-	-	-
32503	+^{c)}	+	+	+	+	+	-	+	+
32504	∅	-	-	-	+	-	-	-	-

Anmerkungen / comments*: Code number [amplification system], target sequence.

a) *Borrelia valaisiana* (VS116), b) *Treponema phagedenis*,

c) *Borrelia garinii* (pBr; ospA Typ 3)

PCR-Targets: 1: ospA nested, 2: fla, 3: recA, 4: 16S rDNA, 5: ITS, 6: ospA & probe hybridization, 7: fla nested, 8: ospA single round PCR & agarose gel analysis, 9: Real Art Borrelia Kit (assay concept does not cover *B. garinii*).

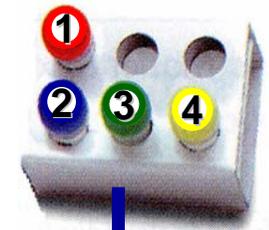


435 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 11.2003

Reischl / Lehn / Wolf

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):



- 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/RIMMH/11.2003

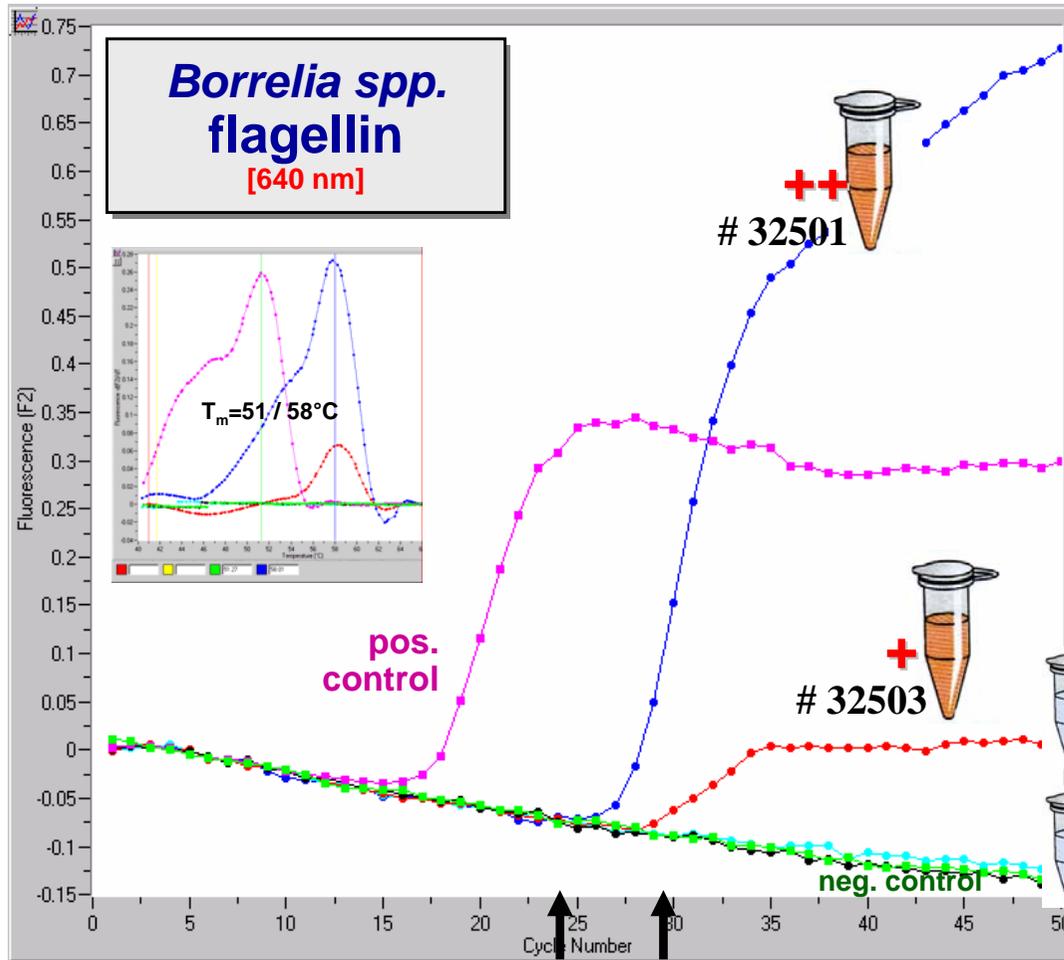


Regensburg

1	Bobu 32501	27.25
2	Bobu 32502	23.34
3	Bobu 32503	28.50
4	Bobu 32504	
5	poKo B. burg. sensu-str.	17.22
6	neg. MM H2O	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ $\sim 10^3$

030923_3_RV-Borrelia-FLA-ampl.bmp

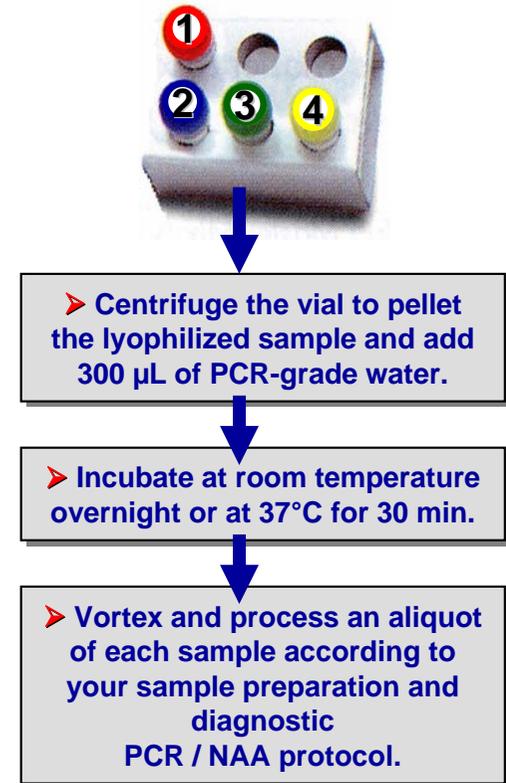
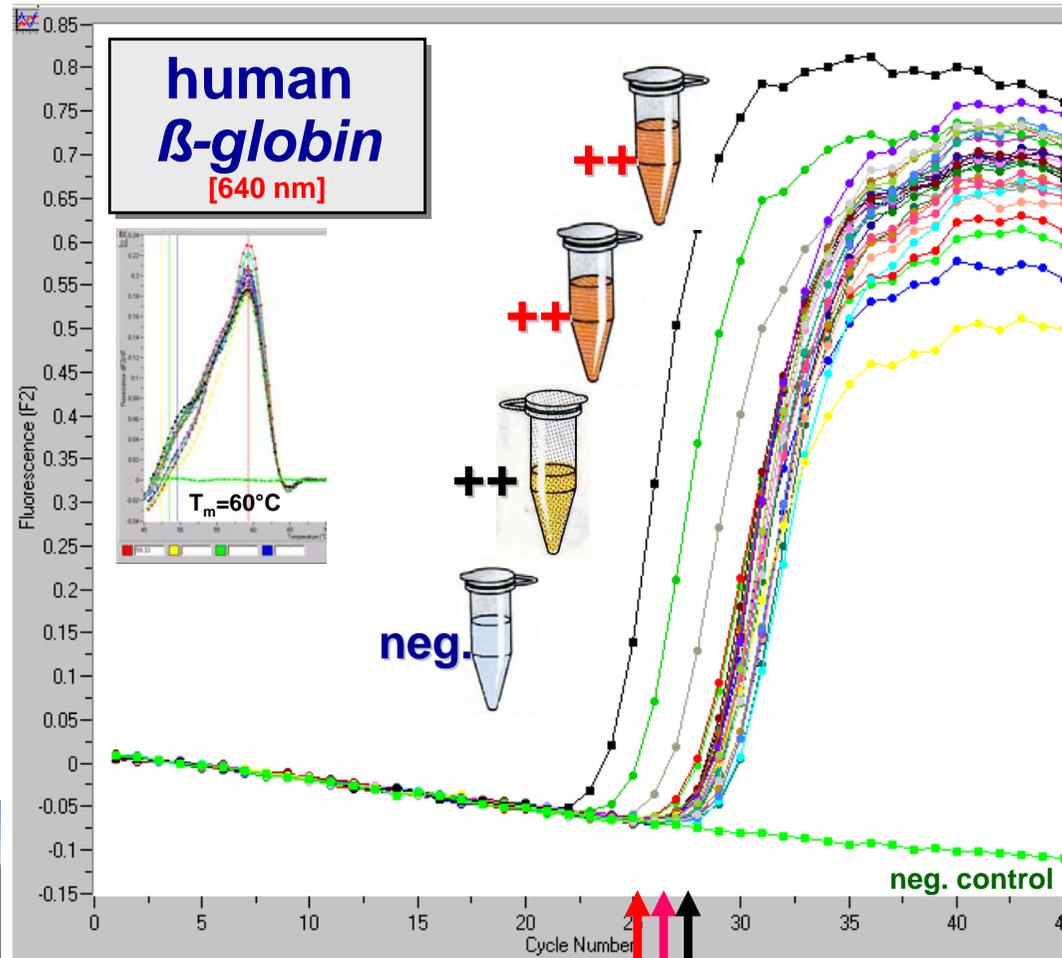
432- 438 Bakteriengenom-Nachweis *all sets*

status 11.2003

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	RV-Bope 32201	27.68
2	RV-Bope 32202	27.04
3	RV-Bope 32203	26.95
4	RV-Bope 32204	27.71
5	RV-Hepy 32301	28.17
6	RV-Hepy 32302	29.03
7	RV-Hepy 32303	28.84
8	RV-Hepy 32304	25.88
9	RV-EHEC 32401	28.74
10	RV-EHEC 32402	28.85
11	RV-EHEC 32403	28.70
12	RV-EHEC 32404	27.72
13	RV-Bobu 32501	27.84
14	RV-Bobu 32502	28.04
15	RV-Bobu 32503	28.14
16	RV-Bobu 32504	28.43
17	RV-Lepn 32601	27.85
18	RV-Lepn 32602	27.58
19	RV-Lepn 32603	28.29
20	RV-Lepn 32604	27.79
21	RV-Salspp. 32701	28.98
22	RV-Salspp. 32702	28.82
23	RV-Salspp. 32703	27.88
24	RV-Salspp. 32704	28.08
25	RV-Lisp 32801	27.97
26	RV-Lisp 32802	24.56
27	RV-Lisp 32803	28.10
28	RV-Lisp 32804	28.50
29	poKo β-Globin 75ng	23.12
30	neg. MM H2O	37.42



LightCycler PCR protocol:
 LightCycler Control Kit DNA
 Roche Cat. No. 2 158 833



human cells / PCR reaction: ~10³

030923_3_RV_β-Globin-ampl.bmp

U. Reischl/RIMMH/11.2003



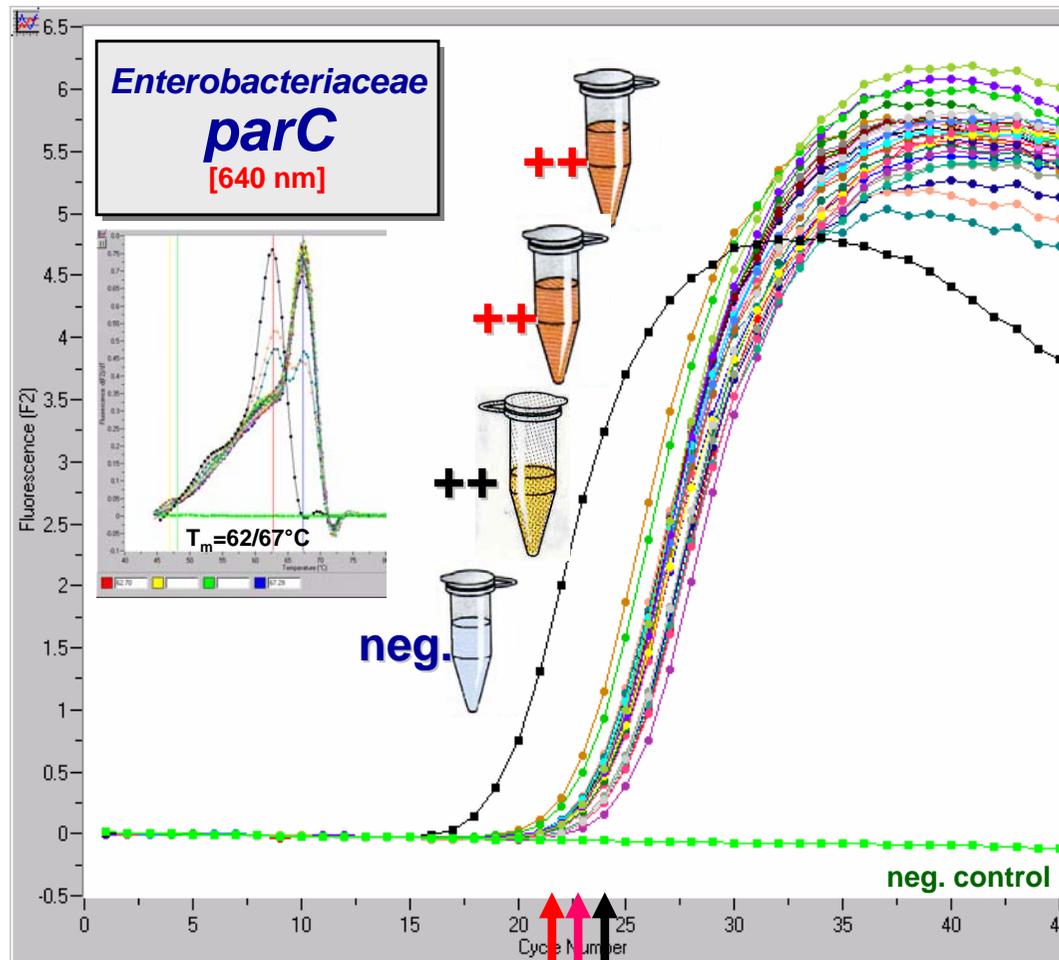
432- 438 Bakteriengenom-Nachweis *all sets*

status 11.2003

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	RV-Bope 32201	23.73
2	RV-Bope 32202	23.57
3	RV-Bope 32203	24.50
4	RV-Bope 32204	23.50
5	RV-Hepy 32301	23.87
6	RV-Hepy 32302	24.30
7	RV-Hepy 32303	24.21
8	RV-Hepy 32304	24.10
9	RV-EHEC 32401	23.05
10	RV-EHEC 32402	24.88
11	RV-EHEC 32403	22.33
12	RV-EHEC 32404	23.07
13	RV-Bobu 32501	23.66
14	RV-Bobu 32502	23.50
15	RV-Bobu 32503	23.81
16	RV-Bobu 32504	23.90
17	RV-Lepn 32601	23.56
18	RV-Lepn 32602	23.45
19	RV-Lepn 32603	24.24
20	RV-Lepn 32604	23.65
21	RV-Salssp. 32701	23.32
22	RV-Salssp. 32702	23.60
23	RV-Salssp. 32703	23.62
24	RV-Salssp. 32704	24.47
25	RV-Lisp 32801	23.75
26	RV-Lisp 32802	22.72
27	RV-Lisp 32803	23.68
28	RV-Lisp 32804	24.32
29	poKo parC (E.coli)	18.76
30	neg. MM H2O	



LightCycler PCR protocol:
 -unpublished-



Enterobact. / PCR reaction: ~10⁵

030924_3_RV_parC-ampl.bmp



- 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.

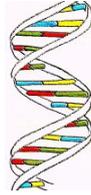
U. Reischl/RIMMH/11.2003



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

***Borrelia burgdorferi* DNA-Nachweis mittels PCR oder anderen Nukleinsäure-Amplifikationstechniken (NAT)**

Information zur Testdurchführung und Code Nummern (2 Seiten)



Vorsichtsmaßnahmen

Die Probenmaterialien wurden einer speziellen Inaktivierungsmaßnahme unterzogen und sind daher **nicht** mehr als potentiell infektiös zu betrachten.

Probenvorbereitung

Die Proben sind nach Erhalt bei 4°C zu lagern.

Als lyophilisiertes Untersuchungsmaterial sind die Proben unmittelbar vor der Testung kurz zu zentrifugieren und dann je in **300 µl** sterilem Wasser (PCR-grade) aufzunehmen.

Die Proben sollten für 20 min. bei Raumtemperatur in einem Thermoschüttler resuspendiert und/oder mehrfach gut gevortext werden. Anschließend sind 100 µl-Aliquots der Proben wie natives klinisches Probenmaterial mit der in Ihrem Labor angewandten Prozedur für die DNA-Extraktion und dem *B. burgdorferi*-PCR/NAT Nachweis zu untersuchen.

Testdurchführung und Ergebnisinterpretation

Das Konzept dieses Ringversuchs ist auf die Bestimmung von *B. burgdorferi* sensu lato DNA im Probenmaterial ausgelegt. Da das Probenmaterial auch Proteine, div. Bakterien und menschliche Zellen beinhaltet, ist die Durchführung und Interpretation von optionalen Inhibitionskontrollen, die auf dem Nachweis humaner Gensequenzen (wie z.B. β -Globin) im Untersuchungsgut beruhen, möglich.

Benutzen Sie bitte die in Ihrem Labor routinemäßig angewendeten Methoden und geben Sie alle Informationen entsprechend der Code-Nummern an. Primär werden in diesem Ringversuch nur qualitative Angaben abgefragt. Die Ergebnisse bitte anhand der Code-Nummern als "positiv", "unterhalb der Nachweisgrenze", "inhibiert" oder "fraglich" angeben.

Die zusätzliche Angabe von quantitativen oder semiquantitativen Ergebnissen (+, +++, etc.) im Bemerkungsfeld ist für die genaue Analyse der Ringversuche sehr hilfreich und daher, wie alle anderen Kommentare, stets willkommen.

Rücksendung des Protokollbogens

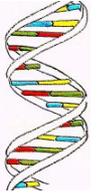
Das ausgefüllte Protokoll bitte zurücksenden an:

Institut für Standardisierung und Dokumentation
im Medizinischen Laboratorium e.V. (INSTAND)
Abt. Qualitätssicherung
Postfach 250211
40093 Düsseldorf.

PCR-/NAA *Borrelia burgdorferi* (RV 435)

Detection of *Borrelia burgdorferi* DNA by PCR or other procedures for nucleic acid amplification & detection (NAA)

Instructions for testing and Code numbers (2 pages)



Precautions

The samples in this panel were subjected to inactivation and they are **not** considered hazardous or capable of transmitting infection.

Specimen preparation

Samples should be stored at 4°C upon receipt.

The closed tubes should be briefly centrifuged to pellet the lyophilized material. Immediately before testing, renature the samples by adding **300 µl** of sterile water (PCR-grade) and incubate at room temperature for 20 min. on an orbital shaker and/or occasional vortexing.

When the pellets are completely dissolved, the resulting suspensions should be considered as native clinical specimens and 100 µl aliquots processed as such using typical protocols for DNA extraction and *B. burgdorferi*-PCR/NAA established in your routine diagnostic setting.

Testing and reporting of results

The concept of this proficiency panel is designed for determination of *B. burgdorferi* sensu lato DNA in the sample material. The sophisticated composition of the sample matrix comprises of proteins, bacteria, and human cells next to the target organisms, thereby allowing for the application of optional inhibition controls targeting human genes (like β -globin, etc.).

Please apply the same methods for DNA extraction and amplification like you are using for the workup of routine clinical samples. Protocol and workflow characteristics should be specified in the Report Form according to the provided code numbers.

Although only reporting of qualitative results is requested, you are free to provide quantitative or semiquantitative data (e.g., +, +++) in the Comments column. The latter information is voluntary, but very helpful for the final evaluation of this proficiency testing program.

Completing of Report Form

Please return the completed Report Form no later than the requested date (postmark date) to:

INSTAND e.V.
Abt. Qualitätssicherung
Postfach 250211
40093 Düsseldorf, GERMANY.

BAKTERIENGENOM-NACHWEIS

CODE-Nummern

PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi* (435)

Die Code Nummern für die Verschlüsselung sind in 6 Gruppen aufgeteilt.

Angaben unter den technischen Kategorien [I] bis [V] erfolgen auf freiwilliger Basis. Sie werden vertraulich behandelt und dienen vor allem zu statistischen Zwecken.

Angaben unter [VI] sind verpflichtend.

Gruppe [I] (DNA Extraktion)

11: Proteinase K / Zentrifugensäulchen
12: Kommerzieller DNA Extraktionskit **
13: Phenol / Chloroform Extraktion 19: Andere **

Gruppe [II] (Amplifikation)

27: Kommerzielles Testsystem / Kit **
28: *In house* PCR Protokoll 29: Andere **

Gruppe [III] (Detektion / Identifizierung)

31: Kommerzielles Testsystem (Codes 21-27)
32: Agarosegel Elektrophorese
33: Hybridisierung mit markierten Sonden
34: Nested PCR
35: Real-Time PCR (TaqMan-Format)
36: Real-Time PCR (LightCycler)
37: DNA Sequenzierung 39: Andere **

Gruppe [IV] (Positiv u/o Inhibitionskontrollen)

41: Kommerzielles Testsystem (Codes 21-27)
42: Interne Kontrolle (rekombinantes Plasmid o.ä.)
43: Externe Kontrollen (Plasmid, β -Globin Gen, etc.)
44: Genomische DNA d. entsprechenden Erregers
48: Andere ** 49: Keine Kontrollen durchgeführt

Gruppe [V] (Zielsequenz)

51: Kommerzielles Testsystem (Codes 21-27)
52: Ribosomales Gen (16S rDNA, 28S rDNA)
53: *OspA* Gen
54: *Fla* Gen
55: Ribosomale ITS Region 59: Andere **

Gruppe [VI] (Ergebnisse)

61: **Positiv** 63: **Fraglich**
62: **Negativ** 64: **Inhibition**

** (bitte unter **Bemerkungen** kurz erläutern)

BACTERIAL GENOME DETECTION

CODE Numbers

PCR-/NAA *Borrelia burgdorferi* (435)

Code numbers are subdivided into six groups. Although providing technical specifications of the applied assays is highly desired for statistical purposes (individual data will be kept confidential), completing groups [I] to [V] is on a voluntary basis.

Completing of group [VI] is mandatory.

Group [I] (Sample preparation)

11: Proteinase K / spin column
12: Commercial DNA extraction kit **
13: Phenol / chloroform extraction 19: Other **

Group [II] (Amplification)

27: Commercial assay system / kit **
28: *In house* PCR assay 29: Other **

Group [III] (Detection / identification)

31: Commercial assay system (codes 21-27)
32: Agarose gel electrophoresis
33: Hybridization with labelled probe
34: Nested PCR
35: Real-Time PCR (TaqMan format)
36: Real-Time PCR (LightCycler)
37: DNA sequencing 39: Other **

Group [IV] (Positive and/or inhibition control)

41: Commercial assay system (codes 21-27)
42: Internal control (recombinant plasmid etc.)
43: External controls (plasmid, β -globin gene, etc.)
44: Genomic DNA of the corresponding pathogen
48: Other ** 49: No inhibition control applied

Group [V] (Target gene)

51: Commercial assay system (codes 21-27)
52: Ribosomal gene (16S rDNA, 28S rDNA)
53: *OspA* gene
54: *Fla* gene
55: Ribosomal ITS region 59: Other **

Group [VI] (Results)

61: **Positive** 63: **Questionable**
62: **Negative** 64: **Inhibition**

** (please specify in the **Comments** section)