



An die Teilnehmer
des 1. INSTAND-Ringversuchs
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 431 bis 435)

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter in English on page 10 of this document.

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

Sie erhalten hiermit die Auswertung des ersten INSTAND-Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken.

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

Bevor es an die eigentliche Auswertung und Analyse der aktuellen Ringversuchsergebnisse geht, vorab noch ein paar Worte in eigener Sache (Auszug aus einem Beitrag für die kommende Ausgabe der Zeitschrift "Der Mikrobiologe"):

Zur mikrobiologischen Diagnostik von bakteriellen Infektionen stehen bekanntermaßen folgende Methoden zur Verfügung:

- Der mikroskopische Nachweis und die grobe morphologische Charakterisierung der Erreger im Direktpräparat.
- Der Nachweis entsprechender Erreger über Anzucht und anschließender biochemischer Differenzierung (was je nach Erreger Tage bis Wochen in Anspruch nehmen kann).
- Der direkte Nachweis von erregerspezifischen Antigenen im Probenmaterial bzw. von erregerspezifischen Antikörpern in Serum infizierter Patienten.
- Der direkte Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäure im klinischen Probenmaterial.

Gerade in den letzten Jahren haben technische und methodische Fortschritte (wie die Einführung von *real-time* PCR-Verfahren) sowie die vielfältigen Bemühungen zur Automatisierung und Standardisierung bestimmter Arbeitsschritte entscheidend dazu beigetragen, daß sich die Diagnostik durch den Nachweis spezifischer Nukleinsäuresequenzen von der arbeitsaufwendigen Spezialuntersuchung hin zur einer routinefähigen Untersuchungsmethode entwickeln konnte. Als schnelles, sensitives und kulturunabhängiges Verfahren bietet sie sich vor allem beim Direktnachweis von langsamwachsenden oder nicht-kultivierbaren Erregern, für die Untersuchung von Probenmaterial antibiotisch vorbehandelter Patienten, sowie für den Nachweis

einiger Toxine oder Pathogenitätsfaktoren an. Letztere sind zwar auf DNA-Ebene genetisch determiniert aber werden aber auf Protein-Ebene nicht immer exprimiert (!).

Ohne hier genauer über potentielle Indikationsgebiete spekulieren zu wollen kann ganz objektiv festgestellt werden, daß sich die im Bereich der Virologie so sehr geschätzten Nukleinsäure-gestützten Nachweisverfahren mittlerweile auch in vielen Bereichen der bakteriologischen Diagnostik bereits einen nicht unwesentlichen Stellenwert erobert haben. Auch wenn hier methodenbedingt keine Lebend-/Tot Unterscheidung der nachgewiesenen Erreger möglich ist und bei vielen Fragestellungen noch umfangreiche Studien zur Beurteilung der so wichtigen positiven- und negativen prädiktiven Werte einzelner Testsysteme ausstehen, so kann der Direktnachweis von Chlamydien, Mycoplasmen, Legionellen, Meningokokken oder Mykobakterien bereits heute mit Hilfe der Nukleinsäurediagnostik schnell und relativ zuverlässig aus dem klinischen Probenmaterial erfolgen.

Mit der steigenden Akzeptanz und vor allem mit der stetig zunehmenden Vielfalt geschlossener Analysesysteme, fertig konfektionierter kommerzieller Testkits oder eigenentwickelter Protokolle zum Nukleinsäurenachweis von mikrobiologisch relevanten Erregern besteht nun auch zunehmend Bedarf an geeigneten Maßnahmen zur externen Qualitätssicherung. Mittlerweile existieren für den NAT-gestützten Nachweis nahezu jeder Bakterienspezies oder genetisch determiniertem Pathogenitätsfaktor zahllose mehr oder weniger gut evaluierte diagnostische Protokolle oder Kit-Systeme die (aus Spezifitäts-, Sensitivitäts- oder manchmal auch "nur" aus Lizenzgründen) jeweils auf individuellen Kombinationen unterschiedlicher Verfahren zur Nukleinsäure-Isolierung aus klinischem Probenmaterial, unterschiedlichen Zielsequenzen sowie auf den verschiedensten Amplifikations- und Detektionsstrategien beruhen. Auch wenn diese methodische Vielfalt einen wichtigen und auch sehr wünschenswerten Motor des wissenschaftlichen Fortschritts darstellt, so erwachsen daraus vor allem am "unteren Teil der Skala" zwangsläufig gewisse Unzulänglichkeiten bei der Vergleichbarkeit von qualitativen oder quantitativen NAT-gestützten Befunden.

Vergleichbar mit der Situation in der virologischen Diagnostik wird auch in den kommenden Jahren das diagnostische Potential bzw. das Spektrum der mittels NAT zuverlässig zu erfassenden bakteriellen Erreger immer breiter werden. Aus diesem Grund sollten die Bestrebungen zur externen Qualitätskontrolle nicht auf einige wenige "prominente" Erreger beschränkt bleiben, sondern (zumindest mittelfristig) auch auf die Verfügbarkeit eines umfassenden Panels verschiedener bakterieller Erreger abzielen.

An dieser Stelle möchte ich aber explizit auf folgenden Sachverhalt hinweisen: Die Verfügbarkeit von Ringversuchen impliziert **nicht per se** die Sinnhaftigkeit des Einsatzes von NAT-gestützten Systemen für die jeweiligen Erreger in einem bestimmten klinischen Probenmaterial. Auch wenn in einem diagnostischen Labor für bestimmte Erreger NAT-gestützte Systeme routinemäßig etabliert oder verfügbar sind, so muß die Indikationsstellung für diese Untersuchungsart durch die Laborleitung bzw. dem Dienstarzt im Einzelfall und stets unter sorgfältiger Abwägung medizinischer und ökonomischer Gesichtspunkte erfolgen.

Man könnte daher leicht geneigt sein, sich bei dem Angebot von Ringversuchen auf das enge Spektrum von bakteriellen Erregern zu beschränken, bei denen die Indikationen für PCR-Untersuchungen als weitgehend gesichert gelten (wie z.B. *Mycobacterium tuberculosis* oder *Chlamydia trachomatis*). Aus unserer Sicht macht es aber dennoch Sinn, auch solche Erreger in die externe Qualitätskontrolle mit einzubeziehen, für deren Nachweis in vielen spezialisierten Instituten und manchen Routinelaboratorien eine Reihe unterschiedlicher Nukleinsäure-gestützter Testsysteme zur Verfügung stehen und die dort auch selektiv an klinischem Untersuchungsmaterial zur Diagnosefindung oder -bestätigung eingesetzt werden.

Abgesehen von einigen sehr begrüßenswerten Ringversuchs-Initiativen auf europäischer Ebene, die aber meist nur auf den Nachweis einzelner Spezies abzielen, gibt es neben INSTAND e.V. derzeit keine andere Institution, die im Bereich der bakteriologischen Diagnostik eine modular strukturierte Palette von NAT-Ringversuchen etabliert hat. Im Bereich der bakteriologischen Diagnostik komplettiert diese neue Serie von Ringversuchen zum Bakteriengenomnachweis somit die seit langem bewährten INSTAND-Ringversuche zur "Bakterienidentifizierung und Sensibilitätsprüfung" sowie zur bakteriologischen "Infektionsserologie".

Von der regelmäßigen Teilnahme an den neuen Ringversuchen zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken können diagnostische Laboratorien auf mehrfache Weise profitieren:

- Sie erfüllen formal die Vorgaben von Zertifizierungs- und Akkreditierungsrichtlinien, die eine "regelmäßige Teilnahme an Maßnahmen zur externen Qualitätskontrolle" fordern.
- Bei mehrfach bestandenen Ringversuchen haben Sie eine gewisse Sicherheit hinsichtlich der Zuverlässigkeit Ihrer PCR-Protokolle oder anderer molekularbiologischer Nachweisverfahren und das erteilte Zertifikat kann als Beleg hinreichender Sensitivität und Spezifität Ihres individuellen Testkonzepts dienen.
- Nicht oder nur teilweise bestandene Ringversuche liefern in der Regel konstruktive Hinweise auf mögliche Fehlerquellen bei der Nukleinsäureisolierung, der Auswahl der Zielsequenz oder den eingesetzten Amplifikations- oder Detektionsverfahren.

Zudem besteht nicht in jeder diagnostisch orientierten Institution die Möglichkeit, alle der angebotenen oder eingesetzten kommerziellen Systeme bzw. Testkits anhand eines umfangreichen und gut charakterisierten Probenpanels im eigenen Labor auf ihre Spezifität und Sensitivität hin zu überprüfen. Ein mittelfristiges Ziel dieser Ringversuche ist daher auch die Identifizierung von bestimmten Testsystemen, die zumindest in der Routineanwendung gewisse Mindestanforderungen nicht zu erfüllen scheinen. Auch wenn im Rahmen dieser Ringversuche keine Standardprotokolle oder zu erreichende untere Nachweisgrenzen für bestimmte Erreger vorgegeben werden sollen, so stehen unsere Bemühungen doch unmittelbar im Einklang mit den Bestrebungen der Fachgesellschaften zur Qualitätssicherung und Standardisierung bei molekularbiologischen Untersuchungsverfahren (z.B. Qualitätsstandards in der mikrobiologisch-infektiologischen Diagnostik, MIQ; Normen der Reihe DIN 58959 "Qualitätsmanagement in der medizinischen Mikrobiologie"; "Checkliste Mikrobiologie und Hygiene – Molekularbiologie in der Infektionsdiagnostik" im Handbuch für die Akkreditierung Medizinischer Laboratorien des AML und ZLG; Richtlinie der Bundesärztekammer zur Qualitätssicherung quantitativer laboratoriumsmedizinischer Untersuchungen, RiLiBäk, etc.). Für Interessierte sei an dieser Stelle auch auf die von der Europäischen Kommission erlassenen "Gemeinsamen Technischen Spezifikationen für *in-vitro* Diagnostika" verwiesen (Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften vom 16.5.2002; Seiten L131/17-30).

KONZEPTION DER RINGVERSUCHSPROBEN BAKTERIENGENOM-NACHWEIS (PCR / NAT)

Ausgangspunkt bei der Konzeption der Ringversuche war natürlich der Wunsch, die Zusammensetzung der versandten Proben so nahe wie möglich an typischem klinischem Untersuchungsmaterial zu orientieren. Dieses Anliegen stand aber teilweise im Widerspruch zu

einigen technischen und organisatorischen Vorgaben. Für die Zusammensetzung der Proben gelten nun folgende einheitliche Spezifikationen:

- Die 4 Proben jedes Probensatzes enthalten definierte, aber unterschiedliche Mengen an Zielorganismen. Eine oder mehrere Proben jedes Sets sind als Negativkontrolle ausgelegt oder enthalten Organismen einer verwandten Spezies bzw. Erreger mit bekannter Kreuzreaktivität von bestimmten NAT-Zielgenen.
- Durch ein spezielles Inaktivierungsverfahren wird die Infektösität der Zielorganismen im Probenmaterial unterbunden; dies reduziert zum einen die Gefahr von Laborinfektionen bei der Durchführung molekularbiologischer Untersuchungen, und zum anderen können die Proben auf dem normalen Postweg versandt werden. Da während des Inaktivierungsprozesses die ursprüngliche Zellwandstruktur der entsprechenden Erreger weitgehend erhalten bleibt, kann im Rahmen der Ringversuche auch die Effizienz der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäureextraktion bewertet werden.
- Bei der Konfektionierung der einzelnen Probenchargen stehen uns ein standardisiertes DNA-Extraktionsverfahren, ein oder mehrere quantitative *real-time* PCR Testsysteme und, falls verfügbar, auch kommerzielle Testsysteme zur Verfügung. Dadurch erfährt bereits der Prozeß der Probenherstellung eine gewisse Qualitätskontrolle, und es kann eine einigermaßen gleichmäßige Verteilung der Zielorganismen zwischen identischen Proben aus unterschiedlichen Probensätzen gewährleistet werden.
- In Anlehnung an typisches klinisches Untersuchungsgut enthalten alle Ringversuchsproben auch einen gewissen Anteil an humanem Zellmaterial. Dies erlaubt eine objektivere Bewertung der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäureisolierung und ermöglicht zudem die Durchführung von NAT-Kontrollreaktionen, die auf dem erfolgreichen Nachweis humaner DNA im Probenmaterial beruhen.
- Alle Proben werden in lyophilisiertem Zustand versandt und enthalten zur Stabilisierung einen gewissen Anteil von Bakterienzellen und Proteinen. Durch die großzügige Bevorratung mit Rückstellproben können Sie bei uns auch nach der eigentlichen Ringversuchsperiode bestimmte Probensätze zu Testentwicklungs- oder Evaluierungszwecken nachbestellen.

AUSBLICK

Bei der Konzeption dieser ersten Sets von NAT-Ringversuchsproben wurden wir seitens INSTAND gebeten, keine extrem hohen Herausforderungen an die Teilnehmer zu stellen. Wundern Sie sich daher bitte nicht, wenn die Unterscheidung zwischen positiven und negativen Proben relativ deutlich ausgefallen ist und manche Proben auch als relativ stark positiv getestet wurden. Sehen Sie diese Runde eher als Einstieg in die Qualitätssicherung im Bereich der bakteriologischen Nukleinsäurediagnostik sowie als Evaluierung unserer speziell dafür konzipierten Probenmatrix. Zunehmende Herausforderungen bezüglich Sensitivität und Spezifität Ihrer jeweiligen Testsysteme sind für die zukünftigen Runden (jeweils im April und November jedes Jahres) fest eingeplant.

Die flexible Zusammensetzung der Probenmatrix und die enge Zusammenarbeit mit zahlreichen Sollwert- und Referenzlaboratorien beim Design und bei der Konfektionierung der einzelnen

Ringversuchsproben gestatten ein schnelles Reagieren auf die Erfordernisse einzelner Teilnehmer. Daher sind wir bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche für alle Anregungen offen und werden bereits im November oder spätestens bis April 2004 versuchen, das derzeitige Panel an erregerspezifischen Ringversuchen um *Legionella pneumophila*, *Listeria monocytogenes* und *Salmonella* spp. zu erweitern. Mit der Einbeziehung der beiden letztgenannten Erreger wollen wir u.a. den zahlreichen Anfragen seitens der Lebensmitteldiagnostik nachkommen.

An dieser Stelle möchten wir uns recht herzlich bei allen Kollegen in den zahlreichen nationalen und internationalen Sollwertlaboratorien sowie bei den Kollegen und Mitarbeitern in Jena, Berlin und Regensburg bedanken, die über viele Monate hochmotiviert an der praktischen Umsetzung unserer gemeinsamen Idee mitgearbeitet haben. Ihr unermüdlicher Einsatz hat einen wesentlichen Teil zur erfolgreichen Etablierung dieser neuen Ringversuchsserie beigetragen. Besonderer Dank gilt auch Herrn Professor Zeichhardt und Herrn Professor Habermehl, die uns vor allem bei der Konfektionierung der Ringversuchsproben mit Ihrer langjährigen Erfahrung auf diesem Gebiet hilfreich zur Seite standen. Zugleich hoffen wir alle auf einen reibungslosen Ablauf der zukünftigen Ringversuchsrunden.

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

APRIL 2003:

Wie bereits zuvor erwähnt, wollten wir bei der Konzeption dieses ersten Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken die Aussendung von grenzwertig positiven Proben vermeiden. Als Richtwert für die "schwächer positiven" Ringversuchsproben galt dabei das 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen). Die Analyse der von allen Teilnehmern übermittelten Ergebnisse erlaubt daher keinen direkten Rückschluß auf die individuelle Sensitivität der eingesetzten Verfahren. Daher werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche 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 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. Eine detaillierte Analyse dieser Testcharakteristika wird sicherlich bei zukünftigen erregerspezifischen Ringversuchen, die auch einzelne Proben mit deutlich geringerer Erregermenge enthalten werden, interessante Information bezüglich der diagnostischen Eignung bestimmter Verfahren oder Zielsequenzen liefern können.

Aber bereits im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren (zugegebenermaßen erwartungsgemäß) einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und werden im Folgenden kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe weiterer 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 431: *Chlamydia trachomatis*

Die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den positiven Proben und die Verfügbarkeit gut evaluierter und z.T. automatisierter NAT-gestützter Analysesysteme führte hier zu hohen Richtigkeitsquoten für positive und negative Befunde. Inhibitionseignisse wurden nicht beobachtet und unter 512 Ergebnissen wurden nur 6 falsch-positive, 8 falsch-negative sowie 1 "fraglicher" Befund mitgeteilt. Auch waren im Rahmen dieses Ringversuchs zwischen den kommerziellen und den selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit zu beobachten.

RV 432: *Bordetella pertussis*

Die hohe Menge an Zielorganismen in den positiven Proben und die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme führte auch bei *B. pertussis* zu relativ hohen Richtigkeitsquoten für positive und negative Befunde. Inhibitionseignisse wurden nicht beobachtet und unter 208 Ergebnissen wurden 7 falsch-positive, 9 falsch-negative sowie 3 "fragliche" Befunde mitgeteilt.

Die überwiegende Anzahl der Teilnehmer verwendete zum NAT-gestützten Nachweis von *B. pertussis* selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen. Aufgrund der derzeit noch sehr geringen Verbreitung von kommerziellen bzw. konfektionierten Testkits für den Nachweis von *B. pertussis* DNA können im Rahmen dieses Ringversuchs keine seriösen Vergleiche zwischen den einzelnen Testsystemen geführt werden.

Auffällig war jedoch die hohe Rate an falsch-positiven Ergebnissen für die Probe 31201, die nennenswerte Mengen an *B. parapertussis* enthielt. Zwei der Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis verwendeten das Pertussis Toxin Gen, und die anderen 4 Teilnehmer gaben IS481 als Zielsequenz für Ihre *B. pertussis*-spezifischen PCR Assays an. Für beide Zielsequenzen ist jedoch keine nennenswerte Kreuzreaktivität mit *B. parapertussis* bekannt und die falsch-positiven Befunde sind wohl nur mit Kontaminationsereignissen oder mit massiv unzureichender Spezifität der ausgewählten Primersequenzen und des Detektionssystems zu erklären.

RV 433: *Helicobacter pylori*

Die Verfügbarkeit gut evaluierter NAT-gestützter Analysesysteme und die relativ großen Mengen an Zielorganismen in den positiven Proben führte beim Nachweis von *H. pylori* zumindest bei den positiven Befunden zu relativ hohen Richtigkeitsquoten. Die Richtigkeitsquote der negativen Befunde wurde durch 3 falsch-positive Ergebnisse für Probe 31304 etwas gedrückt. Diese Probe enthielt *Helicobacter mustelae* und alle der 3 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis gaben die Verwendung von 16S rDNA als Zielsequenz für Ihre *H. pylori*-spezifischen PCR Assays an. Offensichtlich weisen diese Testsysteme gewisse Mängel hinsichtlich ihrer Spezies-Spezifität auf. Dagegen waren bei keinem der Teilnehmer, die *H. pylori*-spezifische Teile des Urease-Gens als Zielsequenz gewählt haben, falsch-positive Ergebnisse für Probe 31304 bzw. eine Kreuzreaktion mit *H. mustelae* zu beobachten.

Alle Teilnehmer verwendeten zum NAT-gestützten Nachweis von *H. pylori* selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen und unter den insgesamt 60 mitgeteilten Ergebnissen waren nur 4 falsch-positive und 2 falsch-negative Befunde. Bei keiner der ausgesendeten Proben wurden dabei signifikante Inhibitionsereignisse beobachtet.

Wie in der Beschreibung des Ringversuchs 433 vermerkt, konnten die einzelnen Teilnehmer auf freiwilliger Basis auch die vermeindliche 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* 28S rDNA. Korrekte Ergebnisse wurden hier bei 6 von 6 Teilnehmern mitgeteilt.

RV 434: EHEC / STEC

Wie bei den zuvor diskutierten erregerspezifischen Ringversuchen, so führte auch beim NAT-gestützten EHEC-Nachweis die relativ hohe Menge an Zielorganismen in den positiven Proben und die Verfügbarkeit gut evaluierter Analysesysteme zu hohen Richtigkeitsquoten. Bei diesem Ringversuch spiegelt sich in der hohen Menge an Zielorganismen jedoch gewissermaßen die Routinesituation wider, da diese Testsysteme auch meist an Übernachtkulturen von Stuhl- oder Lebensmittel-Proben eingesetzt werden. Die Herausforderung bei diesem diagnostischen Ringversuch bestand vielmehr darin, daß bei der Konzeption nicht die klassischen "Prototyp" EHEC-Stämme (wie z.B. O157:H7) sondern willkürlich 2 Routineisolate aus einer Sammlung von *stx*-positiven *E. coli* ausgewählt wurden. Während eines der beiden Isolate (Probe 31403; O26:H11; *stx*₁-positiv, *eae*-positiv) von allen Teilnehmern zuverlässig als EHEC identifiziert

wurde, versagten die Shiga-Toxin-spezifischen PCR-Testsysteme von 8 der insgesamt 43 Teilnehmer an dem zweiten Isolat (Probe 31401; ONT:H12; *stx_{2d}*-positiv, *eae*- und *hlyA*-negativ). Erfreulicherweise wurden aber von jedem Teilnehmer für die beiden negativen Proben dieses Ringversuchs auch richtig-negative Ergebnisse mitgeteilt. Bis auf 4 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von EHEC verwendet und nur von einem Teilnehmer wurde bei einer der ausgesendeten Proben signifikante Inhibition beobachtet.

Die Vielfalt an Kombination verschiedener *E. coli* Serotypen, Shiga-Toxin Subtypen sowie die Unterschiede in der Intimin- und Enterohämolysin-Produktion von EHEC-Isolaten garantiert auch noch für die kommenden Ringversuche Herausforderungen an die individuellen Testsysteme und eine spannende Auswertung der Ergebnisse.

Zudem wurden von 33 Teilnehmern, zumindest in gewissem Umfang, die Ergebnisse der molekulargenetischen Shiga-Toxin Subtypisierung sowie des Nachweises von Intimin- und/oder Enterohämolysin-Genen mitgeteilt. Wenn auch die Typisierung nicht immer vollständig durchgeführt wurde, so waren doch bei 32 von 33 Teilnehmern die Angaben in dem mitgeteilten Umfang korrekt. Dies kann auch als eindrucksvoller Beleg für den hohen technischen und methodischen Stand der molekularbiologischen EHEC-Diagnostik im Teilnehmerkreis der INSTAND-Ringversuche gesehen werden, der, mit Verlaub gesagt, zu großen Teilen einigen geschätzten Kollegen zu verdanken ist, die sich als Pioniere auf diesem Gebiet betätigen bzw. betätigt haben.

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, denn bei der Konzeption der Ringversuchsproben wurde absichtlich kein "Prototyp"-Isolat von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto, sondern vielmehr die in Europa häufig isolierten Stämme von *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* 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.

Bis auf 8 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet. Von den 59 Teilnehmern dieses Ringversuchs wurden insgesamt 236 Ergebnisse mitgeteilt, darunter befanden sich 4 falsch-positive, 12 falsch-negative sowie 2 "fragliche" Befunde. Signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde nur von einem Teilnehmer bei einer der versandten Proben beobachtet.

Die 4 falsch-positiven Ergebnisse lassen sich wohl am ehesten mit Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung oder im Fall von Probe 31501 (*Treponema phagedenis*) mit mangelnder Spezifität der eingesetzten Testsysteme erklären. Auffällig (um nicht zu sagen erwartungsgemäß) war jedoch die relativ hohe Rate an falsch-negativen Ergebnissen für die Proben 31502 (*Borrelia garinii*) und 31504 (*Borrelia afzelii*). Fünf der Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis für Probe 31502 verwendeten kommerzielle oder "andere" Testsysteme, und ein Teilnehmer gab als Zielsequenz das Flagellin-Gen (*fla*) an. Unter den 4 Teilnehmern mit falsch-negativem Ergebnis für Probe 31504 gaben 2 Teilnehmer die Verwendung

"anderer" Testsysteme an und je ein Teilnehmer verwendete 16S rDNA oder *ospA* als Zielsequenz für sein Borrelien-spezifisches *in house* Testsystem.

In Anbetracht der relativ hohen Menge an Zielorganismen in den Ringversuchsproben sind die falsch-negativen Befunde wohl nur durch "Spezifitätslücken" bestimmter Testsysteme für einige der Genospezies innerhalb *Borrelia burgdorferi* sensu lato zu erklären und daher als echter diagnostischer Mangel zu sehen. Bei den betroffenen Teilnehmern besteht daher gewisser Handlungsbedarf, denn selbst die Erregermenge in der "schwächeren" Probe 31504 (mit ca. 1×10^4 Erregeräquivalenten pro ml Probenmaterial) liegt noch deutlich über der Erregermenge, die in einigen klinischen Proben zu erwarten ist und dort auch sicher nachgewiesen werden sollte.

Aufgrund der geringen Anzahl von kommerziellen Testsystemen im Teilnehmerfeld lassen sich 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
1st INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 431 to 435)

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) 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 about this proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)" can be downloaded as 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 will join future rounds of our QC program.

With best personal regards,

Dr. Udo Reischl