



Regensburg, den 28. April 2005

**An die Teilnehmer  
der INSTAND-Ringversuche  
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438)**

**Dear Participant, dear Colleague,**  
*Please find a cover letter in English on page 11 of this document.*

**Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,**

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

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

Falls Sie an einer etwas umfangreicheren Diskussion unserer Ringversuchsaktivitäten im Bereich Bakteriengenom-Nachweis und näheren Informationen zur Konzeption der Ringversuchsproben interessiert sein sollten, sei hier auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: 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.

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**PD Dr. Udo Reischl**  
Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

**Prof. Dr. H. Wolf      Prof. Dr. N. Lehn      Prof. Dr. E. Straube      Prof. Dr. M. Maaß**

### **AKTUELLER HINWEIS:**

Wie bereits erwähnt, sind wir bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche stets bemüht den Anregungen und Wünschen von Seiten der Teilnehmer möglichst zeitnah und professionell Rechnung zu tragen. Daher wird das derzeitige Panel an erregerspezifischen Ringversuchen um "*Chlamydia pneumoniae*" und "MRSA bzw. cMRSA" (sog. community-associated Methicillin-resistente *S. aureus*) erweitert.

Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß, Universität Lübeck, der hier auch als Ringversuchsleiter fungieren wird. Mit der Einbeziehung der beiden letztgenannten Erreger bzw. Erregergruppen wollen wir vor allem den zahlreichen Anfragen seitens humandiagnostisch orientierter mikrobiologischer Laboratorien und aktuellen infektiologischen Notwendigkeiten nachkommen.

**Die Konfektionierung entsprechenden Probenmaterials ist bereits abgeschlossen und alle an unserer Ringversuchsreihe teilnehmenden Laboratorien werden demnächst von INSTAND e.V. ein Anmeldeformular für die Teilnahme an einem probeweisen Ringversuch bekommen.**

Einen erfolgreichen Ablauf dieser Prototyp-Ringversuche vorausgesetzt, werden sie dann ab 2006 als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen.

**Organisatorische Anmerkung:** ab 2006 werden die Ringversuche zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" (jetzt RV 430 bis RV 438) aus organisatorischen Gründen der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Die beiden zusätzlichen Ringversuche werden dann unter der Nummer RV 539 für "MRSA bzw. cMRSA" und der Nummer RV 540 für "*Chlamydia pneumoniae*" aufgeführt.

## **Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer**

### **MÄRZ 2005:**

Nachdem in der vorhergegangenen Runde dieser Ringversuchs-Serie (September 2004) vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wurde bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen wieder der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

Es sei an dieser Stelle auch nochmal darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der letzten Ringversuche verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter nachbestellt werden können. Die jeweiligen Sets an Rückstellproben enthalten unter anderem als "**grenzwertig positiv**" zu bezeichnende Proben für *B. pertussis* (Probe # 32202), *H. pylori* (Probe # 32302), *B. burgdorferi* (Probe # 32503), *L. pneumophila* (Probe # 32601) und für *Salmonella enteritidis* (Probe # 32702).

Auch in den aktuellen Ringversuchssets befinden sich wieder einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 51101), EHEC (Probe # 51402), *L. pneumophila* (Probe # 51604), *Salmonella typhimurium* (Probe # 51702), sowie *L. monocytogenes* (Probe # 51801). Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze beispielsweise als Qualitätskontrollen oder als standardisierte

Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

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 50- bis 100-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, gut evaluierte Primersequenzen).

Bei diesen 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). 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 systematische Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen ist bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den eindeutig positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch EDV-technisch erfasst und bleiben somit für retrospektive Analysen verfügbar.

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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

### **RV 435: *Borrelia burgdorferi***

Ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik sind nach wie vor die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *Borrelia* Genotypen, die, zumindest außerhalb den Vereinigten Staaten von Amerika, mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden. Diese Situation spiegelte sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Wie bereits bei den vorhergegangenen Ringversuchsrunden praktiziert, so wurden auch diesmal bei der Konzeption der 4 Einzelproben nicht nur Verdünnungen von "Prototyp"-Isolaten von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto angefertigt, sondern Proben mit dem in Europa relativ häufig beobachteten Genotyp *Borrelia garinii* und dem in unseren Breiten etwas "exotischeren" *Borrelia burgdorferi* Genotyp bzw. Subspezies *A14S* (Wang et al., J.Clin. Microbiol., 1999, **37**:3025-2028; Namensvorschlag: *Borrelia spielmani* sp. nov.) versandt. Diese beiden *Borrelia*-Spezies unterscheiden sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene in gewissem Umfang von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. *Borrelia garinii* ist in unseren Breiten die wohl am weitesten verbreitete Spezies mit bekanntermaßen hoher pathogener Relevanz.

Probe # 51501 enthielt diesmal eine relativ hohe Menge an *Borrelia burgdorferi* Subspezies *A14S*, die von 70 der insgesamt 71 Teilnehmer als positiv getestet wurde. Probe # 51503 enthielt eine (im Vergleich zu manch typischem klinischen Probenmaterial) doch noch recht ansehnliche Menge an *Borrelia garinii* - die im Rahmen dieses Ringversuchs erfreulicherweise von 67 Teilnehmern zuverlässig und eindeutig nachgewiesen werden konnte. Lediglich 4 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Zwei dieser 4 Teilnehmer verwendeten dabei ein TaqMan *real-time* PCR Protokoll und das Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz, ein Teilnehmer den kommerziellen RealArt *Borrelia* Testkit, und ein Teilnehmer gab 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.

Bis auf 22 Teilnehmer haben alle selbstentwickelte (*in house*) Testsysteme mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen zum NAT-gestützten Nachweis von Borrelien-DNA verwendet; eine signifikante Inhibition der PCR-Reaktion wurde dabei von keinem dieser Teilnehmer beobachtet.

Die insgesamt 3 falsch-positiven Ergebnisse lassen sich wohl am ehesten mit Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung oder im Fall der Probe # 51504 (*Treponema phagedenis*; ein falsch-positives Ergebnis im Teilnehmerkreis) unter Umständen auch mit mangelnder Spezifität der eingesetzten Testsysteme erklären.

Aufgrund der leider immer noch relativ geringen Anzahl von kommerziellen Testsystemen im Teilnehmerfeld lassen sich im Rahmen dieses Ringversuchs derzeit noch keine seriösen Vergleiche zwischen bestimmten kommerziellen Kits und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Da in der letzten Zeit von einigen Firmen die Entwicklung und Vermarktung von diagnostischen PCR-Nachweissystemen für Borrelien DNA angekündigt wurde, und im Fall der Fa. Artus auch schon kommerziell verfügbar sind, könnte sich diese Situation in absehbarer Zeit etwas ändern. Für die nächsten Ringversuchsrunden ist daher ein wachsender Anteil von Teilnehmern mit kommerziellen Testsystemen zu erwarten. Es dürfte für viele Kolleginnen und Kollegen interessant sein, inwieweit künftige kommerzielle Testsysteme mit diagnostischem Anspruch sich hinsichtlich ihrer Spezifität, Sensitivität und auch Speziesabdeckung innerhalb der doch etwas komplexen Gruppe von *Borrelia burgdorferi* sensu lato Isolaten bewähren werden. Anhand der relativ häufigen Anfragen aus dem Kollegenkreis läßt sich zumindest erahnen welche große Nachfrage in dieser Richtung besteht.

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

**Dear Participant, dear Colleague,**

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

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

This highly desired program for external validation was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. As you can learn from "[www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)", this new segment of their huge proficiency testing program is now open for diagnostic laboratories worldwide. We are aiming at two validation rounds per year (April / September), a reasonable price 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 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. Please note that our current panel of pathogen-specific QC sets will be expanded by "*Chlamydia pneumoniae*" and "MRSA / CA-MRSA" within the next few months.

Further information as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our 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.

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,



**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. H. Wolf    Prof. Dr. N. Lehn    Prof. Dr. E. Straube    Prof. Dr. M. Maaß**

## PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi* (RV 435) März 2005



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
51501	++	61	<i>Borrelia burgdorferi</i> ssp. A14S (~ 1x10 <sup>5</sup> org./mL)
51502	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
51503	+	61	<i>Borrelia garinii</i> strain pHei (~ 5x10 <sup>4</sup> organisms/mL)
51504	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i>

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

n = 71	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	51501	51502	51503	51504		51501	51502	51503	51504
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	70	2	67	1	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	0	69	4	70	nein <i>no</i>	70	70	70	70
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	1	0	0	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 = 50)	96	96 / 100	96	98	98 / 100	98
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 11)	21	21 / 22	95	21	21 / 22	95
Other/commercial tests [27] (n = 11)	22	22 / 22	100	22	22 / 22	100

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

**Comments:** --



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>



## 435 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2005

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

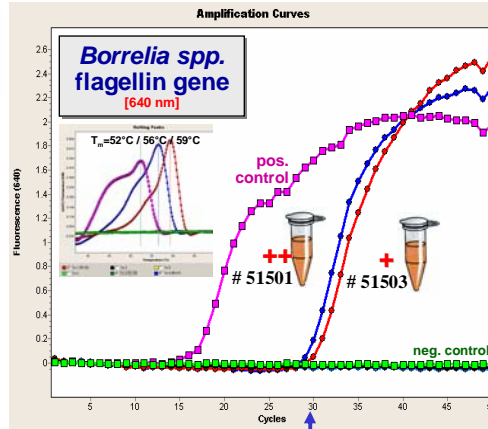
Reischl / Lehn / Wolf

- 1 51501
- 2 51502
- 3 51503
- 4 51504
- 5 Pos Fla
- 6 Neg. control

31.97  
33.08  
20.15



LightCycler PCR protocol:  
unpublished in house protocol.



- neg. #51502
- neg. #51504



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu\text{L}$  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/RMMH/04.2005



INSTAND-E03\_I /05



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>



## 435 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 04.2005

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

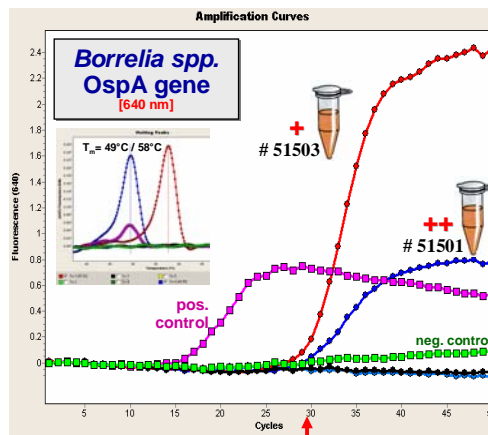
Reischl / Lehn / Wolf

- 7 51501
- 8 51502
- 9 51503
- 10 51504
- 11 Pos Ospa
- 12 Neg. control

37.38  
32.33  
21.74



LightCycler PCR protocol:  
unpublished in house protocol.



- neg. #51502
- neg. #51504



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu\text{L}$  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/RMMH/04.2005



INSTAND-E04\_I /05