



Regensburg, den 23.5.2008

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

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a brief discussion (NEW !) of the current results in English after the German version on the following pages. As usual, tables with the results are in a bilingual style.*

**Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,**

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

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

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

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

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

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

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

**PD Dr. Udo Reischl**

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis  
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

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

May 23, 2008

To the participants of the  
INSTAND-Proficiency Test in  
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. (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.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 (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. 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 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 in 2008:** 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 QC program 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,



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

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### APRIL 2008:

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 bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 81101), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 81003), *Helicobacter pylori* (Probe # 81304), EHEC (Probe # 81402), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 81504), *Legionella pneumophila* (Probe # 81604), *Salmonella enterica* (Probe # 81704), *Listeria monocytogenes* (Probe # 81803), sowie *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila) pneumoniae* (Probe # 81412). 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. **Rückstellprobensätze können bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden.**

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 prozentualem Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum "Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden. Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instandev.de](http://www.instandev.de)) als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

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

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *Borrelia* Genotypen, die, zumindest außerhalb den Vereinigten Staaten von Amerika, mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden, nach wie vor ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik. Diese Situation spiegelte sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Wie bereits bei den vorhergegangenen Probenpanels praktiziert, so wurden bei der Konzeption der 4 Einzelproben keine definierten Suspensionen des amerikanischen "Prototyp"-Isolates von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto angefertigt, sondern diesmal eine Art Verdünnungsreihe des in Europa relativ häufig beobachteten Genotyps *Borrelia afzelii* versandt. Diese *Borrelia*-Spezies unterscheidet sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene in gewissem Umfang von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto. Neben *Borrelia garinii* ist *B. afzelii* in unseren Breiten die wohl am weitesten verbreiteten Spezies mit bekanntermaßen pathogener Relevanz.

Probe # 81501 enthielt diesmal eine relativ hohe Menge an *Borrelia afzelii* ( $\sim 1 \times 10^6$  Organismen/mL), die auch von 96 der insgesamt 97 Teilnehmer als positiv getestet wurde. Probe # 81502 enthielt mit  $\sim 1 \times 10^4$  Organismen pro mL eine etwa hundertfach geringere Menge an *Borrelia afzelii*, deren DNA von 93 Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit  $\sim 1 \times 10^3$  *Borrelia afzelii* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 81504 diesmal eine relativ geringe Menge an Zielorganismen. Erfreulicherweise wurde diese Probe dennoch von 87 der insgesamt 97 Teilnehmer als (richtig-) positiv befundet.

Zwei der 7 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 81504 verwendeten dabei ein TaqMan *real-time* PCR Protokoll und das Flagellin (*fla*)-Gen als spezifische Zielsequenz, und weitere zwei Teilnehmer gaben hier die Verwendung eines *nested* Block-Cycler PCR-Protokolls zur Amplifikation von spezifischen Bereichen der 16S rDNA und anschließender DNA-Sequenzierung zur Charakterisierung der Amplifikationsprodukte an.

Die "negative" Probe # 81503, die eine nenneswerte Menge an *Treponema phagedenis* enthielt, wurde auch diesmal wieder von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet. Lediglich bei 2 der insgesamt 97 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 von keinem Teilnehmer beobachtet. Im Großen und Ganzen waren im Rahmen dieses Ringversuchs auch keine auffälligen Unterschiede hinsichtlich Sensitivität und Spezifität zwischen den jeweils eingesetzten kommerziellen und und der, zumindest aus methodischer Sicht, relativ heterogenen Gruppe von selbstentwickelten (*in house*) Testsystemen zu beobachten. Im Kommentarfeld des Ergebnisformulars wurde hier unter Code [27] "Andere kommerzielle Testsysteme" u.a. die Verwendung folgender Kits aufgeführt: Demeditec Gen Flow *Borrelia plus* (6x), GeneProof *B.burgdorferi* Kit (4x), TibMolbiol LightMix *Borrelia* (2x), Amodia (1x) und Milenia *Borrelia direct* (1x).

**Kommentar zum aktuellen Borrelien-Ringversuch von Herrn Dr. Volker Fingerle** (Nationales Referenzzentrum für Borrelien und Konsiliarlabor für Ehrlichien, Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit):

Insgesamt ist das Ergebnis des aktuellen Ringversuchs zum molekulargenetischen Nachweis von *B. burgdorferi* s.l. doch sehr erfreulich. Immerhin haben knapp 90% der Teilnehmer umgerechnet  $10^2$  Borrelien pro 100  $\mu$ l prozessiertem Probenmaterial noch nachweisen können. Auf der anderen

Seite zeigt sich doch ein deutlicher Verlust der analytischen Sensitivität bei niedriger Borrelienkonzentration im Untersuchungsmaterial: 10 der 97 Teilnehmer konnten die  $10^3$  Borrelien pro mL nicht detektieren. Nachdem davon auszugehen ist, dass die Konzentration von *B. burgdorferi* im infizierten Gewebe nur sehr gering ist, sollte der aktuelle Ringversuch Anlass dafür sein, eine weitere Verbesserung der Sensitivität verschiedener Methoden anzustreben.

Nebenbei ist in diesem Zusammenhang zu betonen: auch in vom Patienten entfernten **Zecken** die zur Vorhersage einer Infektion des Patienten untersucht werden, ist nur von einer kleinen Anzahl Borrelien auszugehen. Diese vom Nationalen Referenzzentrum für Borrelien explizit **nicht empfohlene** Methode wird von verschiedenen Laboratorien angeboten, wird derzeit professionell von Apotheken beworben und firmierte kürzlich in der „Ärzte Zeitung“ u.a. als wichtige Möglichkeit zur Bindung des Patienten: „Borrelientest ist auch Patientenbindung“ ist als Kommentar zu lesen – eine Bindungsverstärkung die der Patient aus eigener Tasche bezahlt versteht sich. Nur 2 mal IGeLn zu 34,98 € Und im Kombipack mit FSME, Anaplasmen und/oder Babesien wird es relativ sogar günstiger... Wenn schon solche Methoden für den begehrten Selbstzahler angeboten werden, dann sollten diese wenigstens den vollmundig versprochenen Leistungsdaten entsprechen. „Werden keine Borrelien gefunden, dann kann ich Entwarnung geben“ wird u.a. verkündet.

## **Brief discussion of the current results (English version) for the growing number of international participants:**

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

As this proficiency testing panel is designed for a specific and sensitive detection of *B. burgdorferi* sensu lato DNA, the positive samples do not exclusively contain suspensions of "prototype" isolates of *B. burgdorferi* sensu stricto - and also other *B. burgdorferi* genotypes or genospecies may be present in individual samples. The current set of QC samples contained a kind of dilution series from *Borrelia afzelii* organisms. A relatively high amount of *Borrelia afzelii* ( $\sim 1 \times 10^6$  organisms/mL) was present in sample # 81501, which consequently was tested positive by 96 of the 97 participating laboratories. Sample # 81502 contained  $\sim 1 \times 10^4$  *Borrelia afzelii* organisms per mL (detected by 93 participants) and sample # 81504, which contained a very low amount of target organisms ( $\sim 1 \times 10^3$  organisms per mL), was only reported positive by 87 of the 97 participants.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*  
 (RV 535) April 2008**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81501	++	61	<i>Borrelia afzelii</i> , PKo (~ 1x10 <sup>6</sup> organisms/mL)
81502	+	61	<i>Borrelia afzelii</i> , PKo (~ 1x10 <sup>4</sup> organisms/mL)
81503	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i>
81504	(+)	61	<i>Borrelia afzelii</i> , PKo (~ 1x10 <sup>3</sup> organisms/mL)

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

n = 97	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	81501	81502	81503	81504		81501	81502	81503	81504
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	96	93	2 <sup>2)</sup>	87	n.d.	3	3	3	3
<b>Negativ</b>	1	4	95	7 <sup>1)</sup>	nein <i>no</i>	94	94	94	94
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	0	0	0	3	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 = 53)	153	153 / 159	96	52	52 / 53	98
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 17)	48	48 / 50 <sup>§</sup>	96	17	17 / 17	100
Other/commercial tests [27] (n = 25)	69	69 / 73 <sup>§</sup>	95	24	24 / 25	96
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> Seven of the 97 participants reported negative results for sample # 81504. 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.

<sup>2)</sup> Two of the 97 participants reported a false-positive result for sample # 81503 (*T.phagedenis*). This could be due to a "simple" cross-contamination event and/or a cross-reactivity of the primer and probe sequences of the "*B.burgdorferi*-specific" PCR assays.



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

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



**535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*** status 04.2008

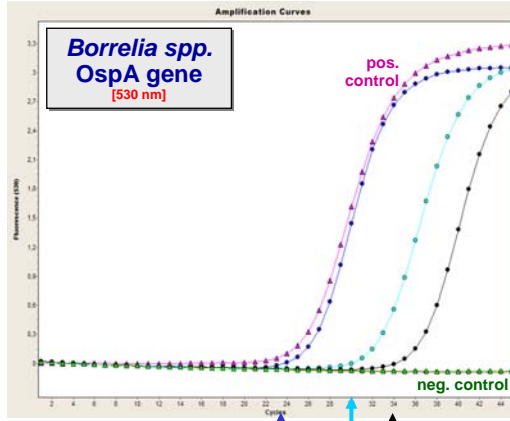
➤ **Evaluation** (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

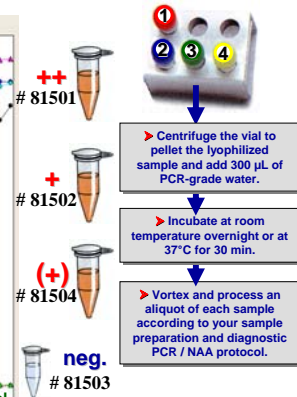
1	81501	25.44
2	81502	31.67
3	81503	
4	81504	35.47
5	pos. Contr. Borrelia	24.90
6	NTC	



LightCycler Tagman PCR protocol:  
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction:  
 ~10<sup>4</sup>      ~10<sup>2</sup>      ~10<sup>1</sup>



INSTAND-E03\_I/08