



Regensburg, den 21. Dezember 2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented 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

December 22, 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", 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", 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"

With best personal regards,



PD Dr. Udo Reischl

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

Prof. Dr. 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

NOVEMBER 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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). Im Rahmen der Testentwicklung bzw. Testoptimierung können diese Probensätze u.a. als Qualitätskontrollen oder als standardisierte Sensitivitätsmarker für die Austestung der unteren Nachweisgrenze von eigenentwickelten Nukleinsäure-gestützten Testsystemen dienen.

An dieser Stelle möchten wir auch darauf hinweisen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch verfügbar sind und bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden können.

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"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 535: *Borrelia burgdorferi*

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsserie bereits mehrfach angesprochen, sind die starken Schwankungen vieler etablierter Testsysteme hinsichtlich ihrer Sensitivität und Spezifität bei der Erfassung von unterschiedlichen *Borrelia* Genotypen, die, zumindest außerhalb den Vereinigten Staaten von Amerika, mit relativ hoher Inzidenz gefunden werden, nach wie vor ein zentrales Problem der NAT-gestützten Borrelien-Diagnostik. Diese Situation spiegelte sich auch in gewissem Umfang bei der Auswertung der bisherigen Ringversuche zum Nachweis von Borrelien-DNA wider. Wie bereits bei den vorhergegangenen Probenpanels praktiziert, so wurden diesmal bei der Konzeption der 4 Einzelproben keine definierten Suspensionen des amerikanischen "Prototyp"-Isolates von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto angefertigt, sondern zwei in Europa vorkommende Genospezies der *B. burgdorferi* sensu lato Gruppe sowie eine Borrelienspezies außerhalb dieser Gruppe versandt.

Probe # 82501 enthielt diesmal eine relativ hohe Menge an *Borrelia duttonii* ($\sim 1 \times 10^6$ Organismen/mL). Diese Borrelienspezies gilt als einer der Erreger des Zeckenrückfallfiebers und zählt definitionsgemäß nicht zu den Genospezies der *B. burgdorferi* sensu lato Gruppe. Erfreulicherweise wurde diese Probe von 88 der insgesamt 94 Teilnehmer als richtig negativ befundet. Probe # 82502 enthielt mit $\sim 1 \times 10^6$ Organismen pro mL diesmal eine relativ hohe Menge an *Borrelia lusitaniae*, deren DNA von 77 der 94 Teilnehmern mit ihren jeweiligen spezifischen PCR-Testsystemen zuverlässig detektiert werden konnte. Mit $\sim 5 \times 10^5$ *Borrelia garinii* Organismen pro mL Probenmaterial enthielt die Probe # 82503 ebenfalls eine nennenswerte Menge an Zielorganismen, die von 90 der insgesamt 94 Teilnehmer als "positiv" befundet wurde. Die beiden letztgenannten *Borrelia*-Spezies unterscheiden sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene in gewissem Umfang von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto - sie sollten aber von diagnostischen Testsystemen mit vergleichbarer Sensitivität erfasst werden. Wie im Rahmen dieser Ringversuchsreihe bereits mehrfach erwähnt, ist *Borrelia garinii* (neben *B. afzelii*) in unseren Breiten die wohl am weitesten verbreitete Spezies mit bekanntermaßen pathogener Relevanz.

Zwei der 6 Teilnehmer mit falsch-positivem Ergebnis bei Probe # 82501 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 # 82504, die lediglich *E. coli* enthielt, wurde auch diesmal wieder von nahezu allen Teilnehmern als negativ befundet. Lediglich bei ca. 10 % der 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 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), TibMolbiol LightMix *Borrelia* (2x), Amodia (1x) und Eligene *Borrelia* RT (1x).

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 relatively high amount of *Borrelia duttonii* (sample # 82501; $\sim 1 \times 10^6$ organisms/mL), which is not a member of the *B. burgdorferi* sensu lato group. As expected, this sample was tested negative by the *B. burgdorferi*-specific NAT assays of 88 participants. A relatively high amount of *Borrelia lusitaniae* ($\sim 1 \times 10^6$ organisms/mL) was present in sample # 82502, which was tested positive by 77 of the 94 participating laboratories. Sample # 82503, which contained approximately 5×10^5 *Borrelia garinii* organisms per mL, was correctly found positive by 90 of the 94 participants. Seven participants reported a false-positive result for the "negative" sample # 82504 (which contained only non-infected human cells and *Escherichia coli*). The latter is presumably due to some intralaboratory cross-contamination events.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82501	∅	62	<i>Borrelia duttonii</i> (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
82502	++	61	<i>Borrelia lusitaniae</i> , PotiB3 (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
82503	+	61	<i>Borrelia garinii</i> SG5, PHei (~ 5x10 ⁵ organisms/mL)
82504	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 94	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	82501	82502	82503	82504		82501	82502	82503	82504
Befund <i>Result</i>									
Positiv	6	77	90	7	n.d.	3	3	3	3
Negativ	88	17	4	87	nein <i>no</i>	91	91	91	91
Fraglich <i>Questionable</i>	0	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 = 53)	91	91 / 106	86	98	98 / 106	92
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 22)	43	43 / 44	98	41	41 / 44	93
Other/commercial tests [27] (n = 17)	30	30 / 34	88	32	32 / 34	94
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	3	3 / 4	75	4	4 / 4	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.



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi* status 11.2008

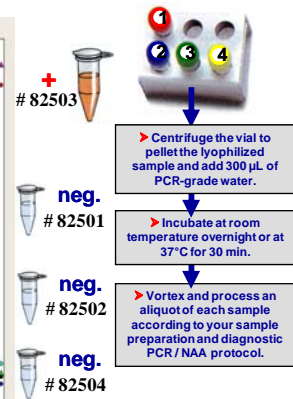
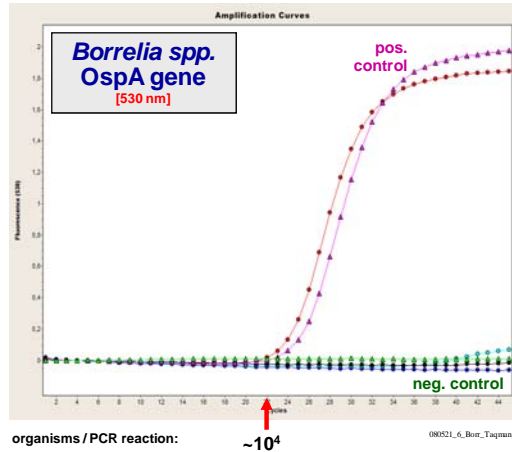
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	82501	
2	82502	35,86
3	82503	23,00
4	82504	
5	pos. Ko. Borrelia	24,24
6	NTC	



LightCycler Taqman PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



INSTAND-E03_II/08



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi* status 11.2007

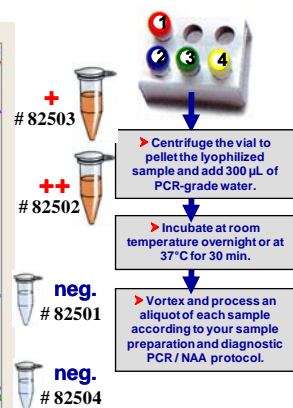
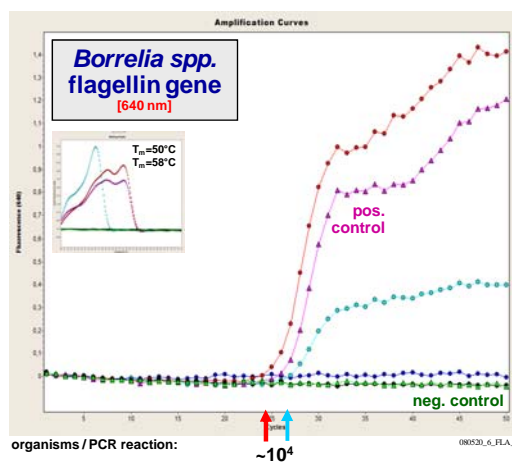
➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	82501	
2	82502	25,18
3	82503	24,18
4	82504	
5	Pos.Contr. BoFla	25,06
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



INSTAND-E04_II/08



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 11.2007

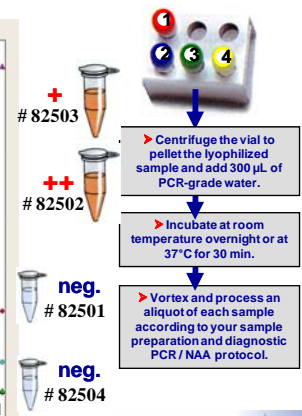
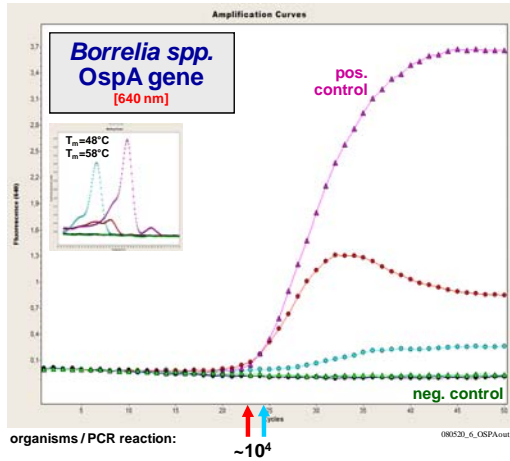
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

- 7 82501 23.39
- 8 82502 22.52
- 9 82503 22.52
- 10 82504 23.13
- 11 Pos.Contr. OspA oc 23.13
- 12 NTC



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



INSTAND-E05_II/08



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 11.2007

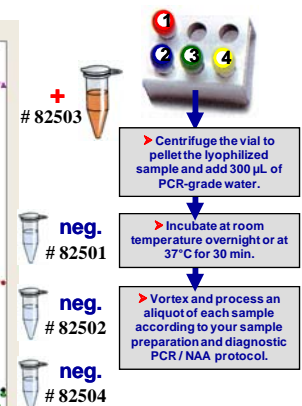
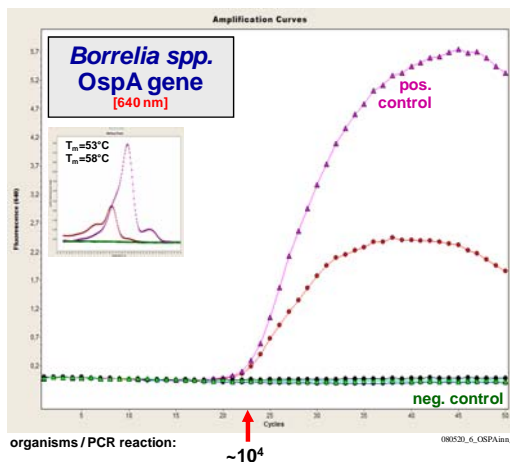
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

- 13 82501 21.15
- 14 82502 21.15
- 15 82503 21.15
- 16 82504 21.82
- 17 Pos. Contr. OspA int 21.82
- 18 NTC



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



INSTAND-E06_II/08