



Regensburg, den 19. Oktober 2005

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche
Bakteriengenomnachweis PCR / NAT**
(INSTAND-Ringversuchsnummern 430 bis 438 und 539 bis 540)

Dear Participant, dear Colleague,
Please find a cover letter in English on page 2 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

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 430 to 438 and 539 to 540)

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", 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" by April 2006.

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.

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

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. Nach dem erfolgreichen Verlauf der aktuellen Probe-Ringversuche werden RV 539 "MRSA bzw. cMRSA" (sog. community-associated Methicillin-resistente *S. aureus*) und RV 540 "*Chlamydia pneumoniae*" nun als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen.

Die Konzeption und Auswertung der *Chlamydia pneumoniae*-spezifischen Ringversuche erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit Herrn Professor Maaß, Universitätsklinikum Salzburg, 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.

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 neu hinzukommenden 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

SEPTEMBER 2005:

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie 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 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 u.a. 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 # 52101), *B. pertussis* (Probe # 52204), EHEC (Probe # 52401), *L. pneumophila* (Probe # 52603), *L. monocytogenes* (Probe # 52801), MRSA (Probe # 52903), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 52411). 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 den meisten 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. 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 auch immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

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"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

RV 435: *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 auch diesmal bei der Konzeption der 4 Einzelproben nicht nur Verdünnungen des amerikanischen "Prototyp"-Isolates von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto angefertigt, sondern vielmehr Proben mit den in Europa relativ häufig beobachteten Genotypen *Borrelia garinii* und *Borrelia afzelii* 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* und *Borrelia afzelii* sind in unseren Breiten die wohl am weitesten verbreiteten Spezies mit bekanntermaßen pathogener Relevanz. Dagegen handelt es sich bei ***Borrelia recurrentis*** um **Rückfallfieber-Borrelien** und nicht um einen Erreger aus dem *Borrelia burgdorferi* sensu lato Komplex. Grundsätzlich muß dieser Erreger natürlich nachgewiesen werden - aber nicht im Zusammenhang mit einer *Borrelia burgdorferi* sensu lato-spezifischen PCR.

Probe # 52502 enthielt diesmal eine relativ hohe Menge an *Borrelia garinii*, die auch von 67 der insgesamt 72 Teilnehmer als positiv getestet wurde. Lediglich 5 Teilnehmer berichteten hier ein falsch-negatives Ergebnis. Zwei dieser 5 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 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. Probe # 52504 enthielt eine (im Vergleich zu manch typischem klinischen Probenmaterial) doch noch recht ansehnliche Menge an *Borrelia afzelii* - die im Rahmen dieses Ringversuchs erfreulicherweise von 69 Teilnehmern zuverlässig und eindeutig nachgewiesen werden konnte.

Bis auf 20 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 lediglich von einem Teilnehmer bei zwei Einzelproben beobachtet.

Überraschenderweise wurden diesmal eine relativ hohe Zahl von falsch-positiven Ergebnissen berichtet. Von den insgesamt 23 falsch-positiven Ergebnissen entfielen 13 auf die Probe # 52503 (*Treponema phagedenis*) und 10 auf Probe # 52501 (*Borrelia recurrentis*). In ersterem Fall lassen sich diese wohl am ehesten mit Kontaminationsereignissen während der individuellen Probenaufarbeitung bzw. mit einer mangelhaften 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. Aus der differenzierten Aufstellung in Tabelle 3 wird jedoch zweifellos hervor, daß die 11 Teilnehmer mit dem RealArt *Borrelien* Testsystem der Fa. Artus, zumindest im Durchschnitt, ganz respektable Ergebnisse erzielen konnten.

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



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
52501	∅	62	<i>Borrelia recurrentis</i> (~ 1x10 ⁵ organisms/mL)
52502	+	61	<i>Borrelia garinii</i> strain PBr (~ 5x10 ⁵ organisms/mL)
52503	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i>
52504	+	61	<i>Borrelia afzelii</i> strain PKo (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)

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

n = 72	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	52501	52502	52503	52504		52501	52502	52503	52504
Befund Result									
Positiv	10 ¹⁾	67	13 ²⁾	69	n.d.	1	1	1	1
Negativ	60	5	59	3	nein no	70	71	70	71
Fraglich Questionable	2	0	0	0	ja yes	1	0	1	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
In house PCR assay [28] (n = 50)	95	95 / 102	93	84	84 / 102	82
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 11)	20	20 / 22	91	21	21 / 22	95
Other/commercial tests [27] (n = 9)	16	16 / 18	88	22	18 / 18	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: ¹⁾ Due to the relatedness of *B. recurrentis* with the target organisms *B. burgdorferi* sensu lato, positive PCR results with sample 52501 are not rated as false-positive.
²⁾ From the 13 participants with a false positive result for sample 52503, 11 indicated the use of an *in house* PCR assay (code 28).



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 09.2005

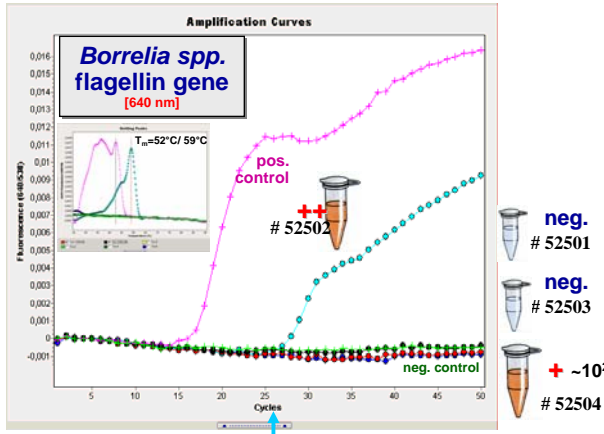
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

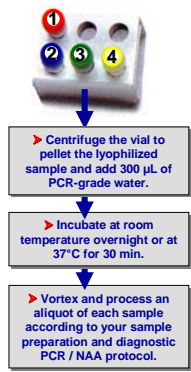
1	Bobu 52501	
2	Bobu 52502	26,46
3	Bobu 52503	
4	Bobu 52504	
5	Pos control FLA	16,48
6	Neg control	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



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



U. Reischl/RIMMH/09.2005



INSTAND-E03_II /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 09.2005

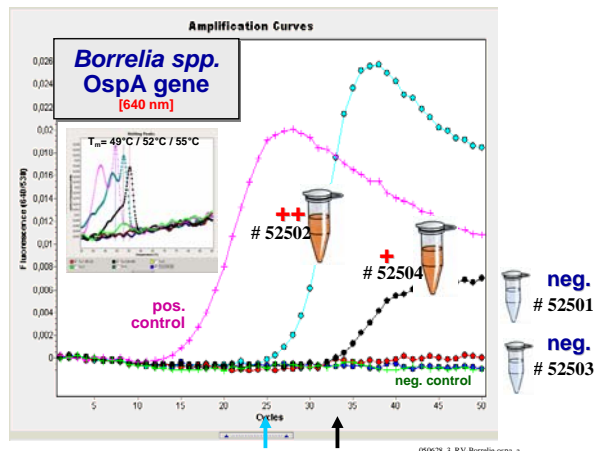
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

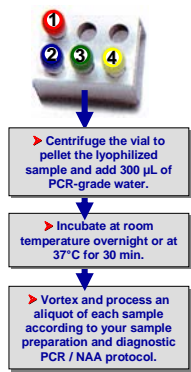
7	Bobu 52501	
8	Bobu 52502	28,57
9	Bobu 52503	
10	Bobu 52504	33,08
11	Pos control OspA	17,12
12	Neg control	[2,57]



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$ $\sim 10^2$



U. Reischl/RIMMH/09.2005



INSTAND-E04_II /05