



Regensburg, den 27. Oktober 2006

**An die Teilnehmer
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 540)**

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find a cover letter in English on page 2 of this document and
tables with the results in a bilingual style after the discussion in German language.*

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

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 530 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 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.

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

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2006:

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 befinden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 62003, # 62102, und # 62103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 62001), EHEC (Probe # 62401), *Legionella pneumophila* (Probe # 62601), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Proben # 63412 und # 63414). 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 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)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. 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 burgdorferi* Spezies und Subtypen, die, zumindest außerhalb den USA, 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. Diesmal wurden je eine Probe von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto (Stamm PKa2) sowie der in Europa relativ häufig beobachteten Spezies *Borrelia garinii* (Stamm PRab) versandt. *Borrelia garinii* zählt in unseren Breiten zu den wohl am weitesten verbreiteten *Borrelia*-Spezies mit bekanntermaßen pathogener Relevanz und unterscheidet sich auf Nukleinsäureebene, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene, definitiv von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Probe # 62501 enthielt diesmal eine nennenswerte Menge von ca 10^4 Bakterien/ml an *Borrelia garinii*, die von 79 der insgesamt 82 Teilnehmer auch als positiv befundet wurde. Zwei der 3 Teilnehmer mit falsch-negativen Ergebnis bei Probe # 62501 führten lediglich die Verwendung eines "kommerziellen Testsystems" an. Der dritte Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis gab die Verwendung eines selbstentwickelten (*in house*) Testsystems mit Inhibitions- und/oder Positivkontrollen und dem *fla*-Gen als *Borrelia burgdorferi* sensu lato-spezifische Zielsequenz an. Probe # 62502 des aktuellen Ringversuchs enthielt eine (im Vergleich zu manch typischem klinischen Probenmaterial) doch noch recht ansehnliche Menge von 10^4 /ml an *Borrelia burgdorferi* s.s.- die im Rahmen dieses Ringversuchs erfreulicherweise von 81 Teilnehmern zuverlässig und eindeutig nachgewiesen werden konnte. Lediglich ein Teilnehmer übermittelte hier ein falsch-negatives Ergebnis.

Im Gegensatz zum letzten Ringversuch wurden diesmal auffallend wenig falsch-negative Ergebnisse beobachtet. Dies ist wohl vorwiegend auf die etwas höheren Mengen an Zielorganismen in den positiven Proben des aktuellen Ringversuchs zurückzuführen. Die Mehrzahl 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 dabei lediglich von einem Teilnehmer bei einer Einzelprobe beobachtet.

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 Testsystemen hinsichtlich Sensitivität, Spezifität oder Kontaminationsanfälligkeit führen. Aus der differenzierten Aufstellung in Tabelle 3 wird jedoch deutlich, daß die 13 Teilnehmer mit dem kommerziellen RealArt *Borrelia* Testsystem (mit Ausnahme eines als "fraglich" klassifizierten PCR-Befundes für Probe # 62504) durchwegs korrekte Ergebnisse erzielen konnten.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 535) September 2006**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
62501	+	61	<i>Borrelia garinii</i> strain PRab (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
62502	+	61	<i>Borrelia burgdorferi</i> strain PKa2 (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
62503	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i>
62504	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 82	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	62501	62502	62503	62504		62501	62502	62503	62504
Befund <i>Result</i>									
Positiv	79	81	2	0	n.d.	0	0	0	0
Negativ	3	1	80	81	nein <i>no</i>	82	82	82	81
Fraglich <i>Questionable</i>	0	0	0	1	ja <i>yes</i>	0	0	0	1

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 = 55)	108	108 / 110	98	109	109 / 110	99
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 13)	26	26 / 26	100	25	25 / 25 [§]	100
Other/commercial tests [27] (n = 13)	24	24 / 26	92	25	25 / 26	96
Andere/ k.A. / other [29] (n = 1)	2	2 / 2	100	2	2 / 2	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.

§ Due to reporting questionable results, the number of true results (denominator in the "relative" column) have been reduced.

Comments: ---



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 09.2006

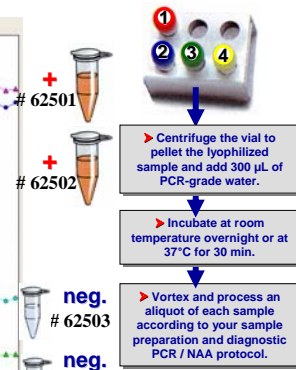
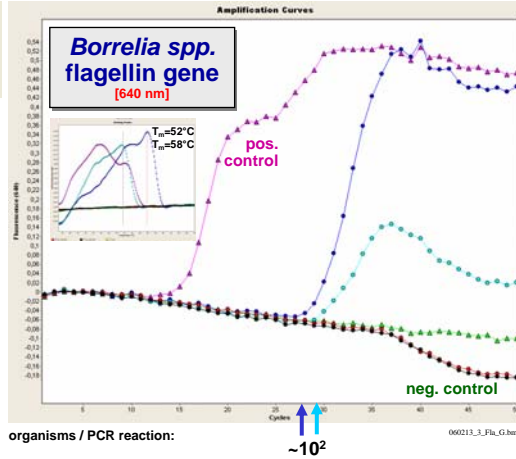
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

5	Positive <i>B. burgdorferi</i>	14,83
6	Negative control	
7	RV 62501	29,21
8	RV 62502	29,57
9	RV 62503	
10	RV 62504	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-E03_II/06



535 Bakteriengenom-Nachweis *Borrelia burgdorferi*

status 09.2006

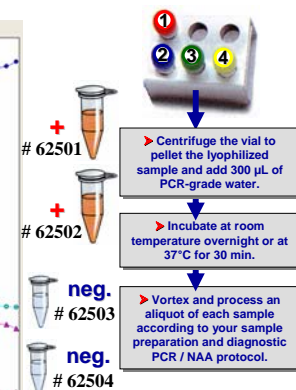
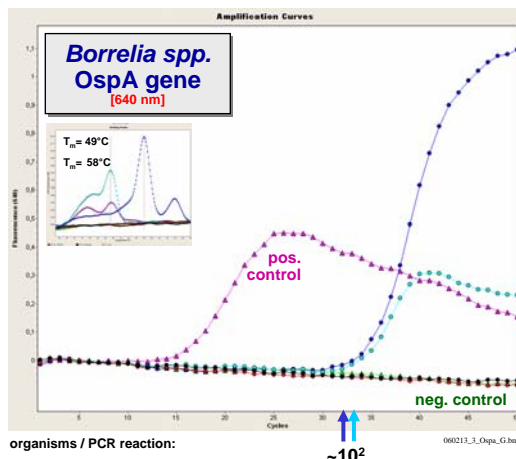
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

15	Positive <i>B. burgdorferi</i>	16,39
16	Negative control	
17	RV 62501	35,41
18	RV 62502	33,68
19	RV 62503	
20	RV 62504	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-E04_II/06



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 09.2006

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

Reischl / Lehn / Wolf

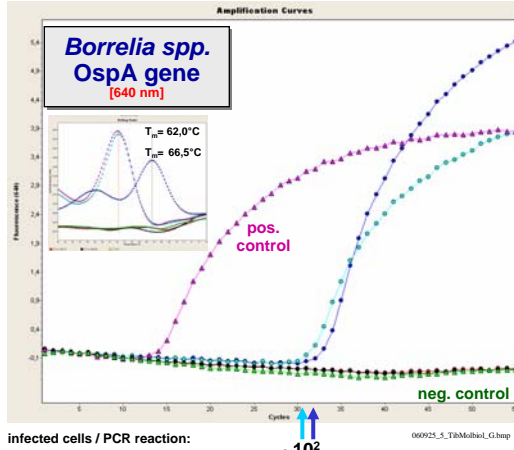
10	RV 62501	31,65
11	RV 62502	29,98
12	RV 62503	
13	RV 62504	
14	Borrelia Y6805	12,72
17	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Proprietary *Borrelia* spp.-specific
 LightCycler assay developed by
 TIB Molbiol, Berlin, Germany
 (<http://www.tib-molbiol.de>).

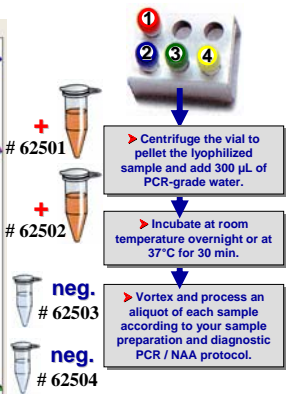


Borrelia spp.
 Cat.No.40-0295-16



infected cells / PCR reaction:

~10²



U. Reischl/RIMMH/09.2006



IN STAND-E05_II/06