



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE
UNIVERSITÄT REGENSBURG
DIREKTOR: PROF. DR. HANS WOLF

WHO Collaborating Centre
for Research and Control of
Virus-associated Cancers



WHO Collaborating Centre
for Reference and Research
on Viral Hepatitis



PD DR. UDO REISCHL, TEL: (0941) 944-6450 FAX: -6402

MOLEKULARE DIAGNOSTIK

Regensburg, den 19. Oktober 2007

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

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find a cover letter in English on page 16 of this document and
tables with the results 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, Prof. Dr. N. Lehn, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

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. Um unser Spektrum an respiratorischen Pathogenen sinnvoll zu erweitern, werden wir ab April 2008 einen zusätzlichen Ringversuch **RV 541 "Mycoplasma pneumoniae"** anbieten. Interessierte Laboratorien konnten sich bereits im Vorfeld bei INSTAND e.V. für die Teilnahme an einem Probe-Ringversuch anmelden von dem diesmal nur eine limitierte Anzahl von Probensets verfügbar war. Eine kurze Diskussion dieses Probe-Ringversuchs findet sich in dieser Auswertung. Nach der erfolgreichen Evaluierung wird dieser neue Ringversuch zusammen mit den bereits etablierten Ringversuchen für *Chlamydia pneumoniae* und *Legionella pneumophila* als fester Bestandteil in das PCR/NAT-Ringversuchsprogramm von INSTAND e.V. aufgenommen. Damit ist der weltweit erste regelmäßige Ringversuch für den gezielten Nachweis von *Mycoplasma pneumoniae* DNA verfügbar und das sog. "CAP-Panel", zumindest bezüglich der bakteriellen Erreger, für die ein NAT-gestützter Nachweis in vielen Fällen sinnvoll sein kann, weitgehend abgedeckt.

Die Konzeption und Auswertung des neuen *Mycoplasma pneumoniae*-spezifischen Ringversuchs erfolgt dabei in enger Zusammenarbeit mit **Herrn Professor Jacobs** vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der Technischen Universität Dresden.

Angesichts der wachsenden Zahl an einzelnen und damit auch individuell zu diskutierenden Ringversuchen werde ich mich zukünftig bemühen, den Umfang dieser turnusmäßigen Ringversuchsauswertung in überschaubaren Grenzen zu halten und dabei dennoch versuchen alle essentiellen Informationen für die einzelnen Teilnehmer darzustellen. Ich hoffe, daß dies in zufriedenstellender Weise gelingen wird und freue mich natürlich auf jede Art von Rückmeldung aus dem Kreis der geschätzten Ringversuchsteilnehmer.

Aufgrund der überraschend hohen Anzahl an Teilnehmern wurden bei diesem Ringversuch für einige der angebotenen Parameter zwei unterschiedliche Gruppen von Probensets ausgesandt. Diese beiden Gruppen sind in den entsprechenden Tabellen separat aufgeführt und statistisch ausgewertet. Im Rahmen dieser Diskussion werden die beiden Gruppen aber nur dann gesondert diskutiert, wenn irgendwelche Auffälligkeiten in der Testperformance zu beobachten waren.

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

SEPTEMBER 2007:

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 # 72002, # 72102, # 72103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 72001), *Bordetella pertussis* (Probe # 72201 und 72207), *Helicobacter pylori* (Probe # 72303), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 72502 und # 72504), MRSA (Proben # 72901), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 72414) sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 72422). 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.

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) 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. 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 der in Europa relativ häufig beobachteten Spezies *Borrelia garinii* (Stamm pBr) und *Borrelia valaisiana* (Stamm VS116) versandt. Zumindest *Borrelia garinii* zählt in unseren Breiten zu den wohl am weitesten verbreiteten *Borrelia*-Spezies mit bekanntermaßen pathogener Relevanz und unterscheidet sich auf Nukleinsäureebene, wie und auch *Borrelia valaisiana*, zumindest innerhalb einiger populärer PCR-Zielgene, definitiv von *Borrelia burgdorferi* sensu stricto.

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben der **Gruppe A** enthielt diesmal zwei positive Proben: Probe # 72504 wurde mit ca 10^4 Bakterien/ml an *Borrelia valaisiana* versetzt, die von 70 der insgesamt 82 Teilnehmer auch als positiv befundet wurde. Probe # 72502 dieses Sets enthielt ca 10^4 Bakterien/ml an *Borrelia garinii*, die mit den NAT-Testsystemen von 76 Teilnehmern - und damit offensichtlich etwas zuverlässiger als *Borrelia valaisiana* nachgewiesen werden konnten.

Bei genauerer Analyse der 12 falsch-negativen Ergebnisse für Probe # 72504 (*Borrelia valaisiana*, ca 10^4 Bakterien/ml) wurde von 10 Teilnehmern die Verwendung von selbstentwickelten *in-house* Testsystemen angegeben (4 davon auf Basis des Flagellin Gens und 6 auf Basis des *B. burgdorferi* *ospA* Gens). Neben einem Teilnehmer mit nicht näher spezifizierten kommerziellem Testsystem berichtete lediglich einer der insgesamt 13 Teilnehmer mit dem RealArt *Borrelia* Testsystem ein falsch-negatives Ergebnis für Probe # 72504.

Interessanterweise wurde von 11 der insgesamt 89 Teilnehmer ein positives PCR-Ergebnis für Probe # 72503 berichtet, die lediglich eine nennenswerte Menge an *Treponema phagedenis* enthielt. Da im Rahmen unserer vorhergegangenen Ringversuche Kreuzreaktionen von Borrelien-spezifischen PCR Testsystemen mit DNA von *T. phagedenis* nicht in diesem Ausmaß beobachtet worden waren spricht dies wohl eher für das etwas gehäufte Auftreten von laborinternen Kontaminationsereignissen.

Innerhalb der 4 Ringversuchsproben der **Gruppe B** befanden sich diesmal zwei positive Proben: Probe # 72506 wurde mit einer Menge von ca 10^6 Bakterien/ml an *Borrelia valaisiana* versetzt, und die Probe # 72507 dieses Sets enthielt ca 10^6 Bakterien/ml an *Borrelia garinii* (Stamm pBr).

An dieser Stelle eine **Anmerkung zum Nachweis von *Borrelia valaisiana* von Dr. med. V. Fingerle, Nationales Referenzzentrum für Borrelien, Max v. Pettenkofer Institut, München:**

Ob diese ebenfalls zum *B. burgdorferi* sensu lato Komplex zählende Spezies humane Erkrankungen verursachen kann ist noch nicht abschließend geklärt. Obwohl *B. valaisiana* in wenigen Einzelfällen aus Patientenmaterial nachgewiesen werden konnte, spricht die ganz überwiegende Mehrzahl der Studien gegen eine relevante humanpathogene Potenz dieser Spezies. So fanden wir beispielsweise bei 242 Patientenisolaten aus Süddeutschland in keinem Fall *B. valaisiana*, während diese Spezies bei durchschnittlich 14 %, lokal sogar bei bis zu 26 % der borrelieninfizierten Zecken aus Süddeutschland nachweisbar war.

Speziell für die vom Nationalen Referenzzentrum nicht empfohlene Untersuchung von vom Menschen entfernten Zecken um daraus eine Therapieindikation abzuleiten ist deshalb die Angabe der nachgewiesenen Borrelienspezies **ggf. mit Hinweis auf die fragliche Humanpathogenität** auf dem Befund notwendig.

Insgesamt befanden sich unter den insgesamt 356 mitgeteilten Ergebnissen der 89 Teilnehmer 17 falsch-negative, ein fragliches und 13 falsch-positive Ergebnisse. Entsprechende Zertifikate konnten insgesamt 85 Teilnehmern erteilt werden.

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.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 535) September 2007, Group A**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
72501	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
72502	+	61	<i>Borrelia garinii</i> , pBr (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)
72503	∅	62	<i>Treponema phagedenis</i>
72504	+	61	<i>Borrelia valaisiana</i> , VS116 (~ 1x10 ⁴ organisms/mL)

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

n = 82	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	72501	72502	72503	72504		72501	72502	72503	72504
Befund <i>Result</i>									
Positiv	2	76	11 ¹⁾	70	n.d.	2	2	2	2
Negativ	80	5	71	12	nein <i>no</i>	80	80	80	80
Fraglich <i>Questionable</i>	0	1	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)	87	87 / 100	87	92	92 / 100	92
RealArt <i>Borrelia</i> [20] (n = 13)	24	24 / 26	92	22	22 / 26	85
Other/commercial tests [27] (n = 17)	31	31 / 33 [§]	94	33	33 / 34	97
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	4	4 / 4	100	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.

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

1) Eleven of the 82 participants reported a false-positive result for sample # 72503 (*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.

**PCR-/NAT *Borrelia burgdorferi*
 (RV 535) September 2007, Group B**



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

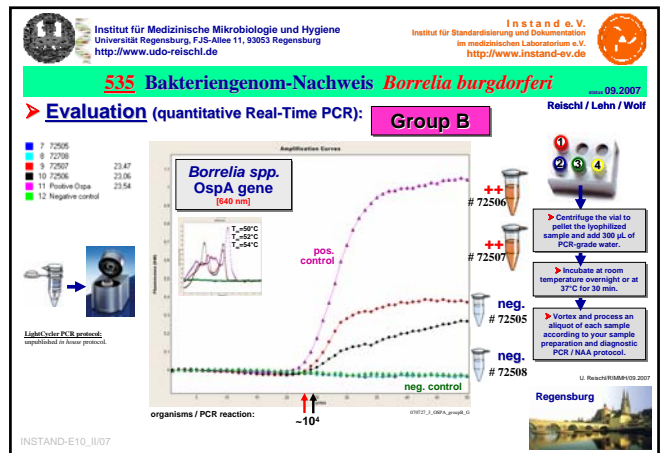
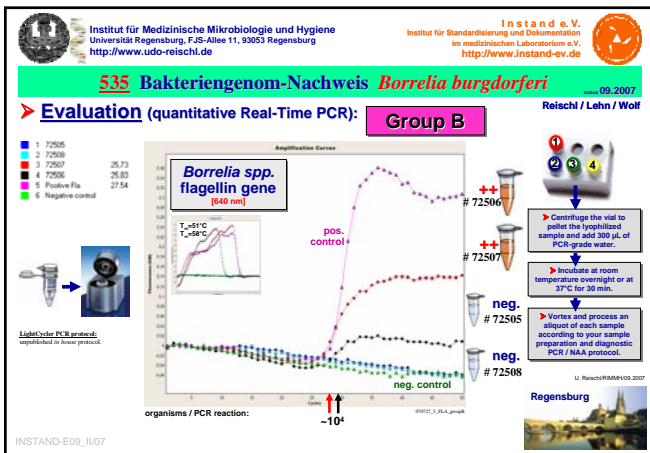
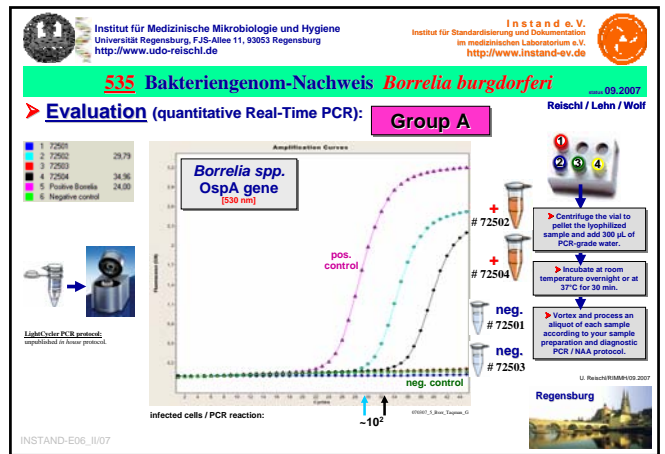
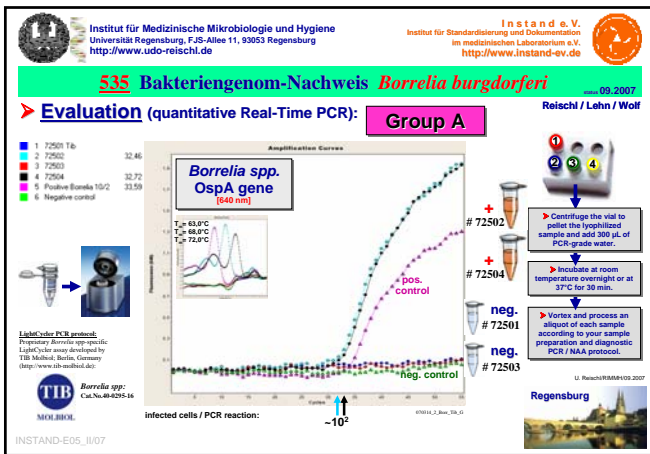
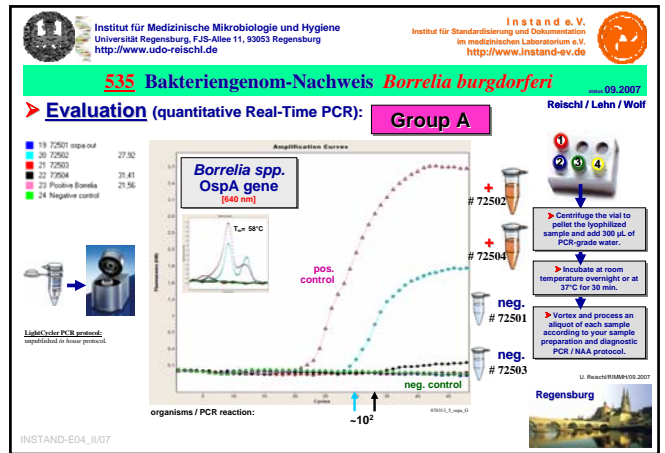
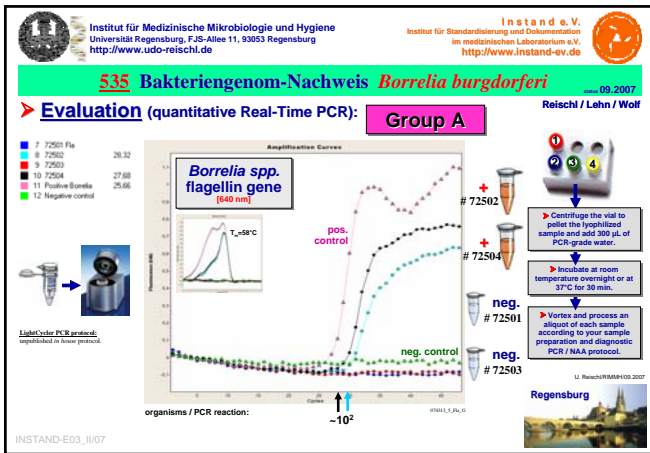
Gruppe B	<i>Erwartet / expected</i>		<i>Probenzusammensetzung / Sample composition</i>
72505	∅	62	<i>Leptospira spp.</i>
72506	++	61	<i>Borrelia valaisiana</i> , VS116 (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
72507	++	61	<i>Borrelia garinii</i> , pBr (~ 1x10 ⁶ organisms/mL)
72508	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

<i>n = 7</i>	Probennummer (Sample no.)									
Befund Result	72505	72506	72507	72508	Inhibition					
					72505	72506	72507	72508		
Positiv	0	7	7	0	n.d.	0	0	0	0	
Negativ	7	0	0	7	nein no	7	7	7	7	
Fraglich Questionable	0	0	0	0	ja yes	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 = 7)	14	14 / 14	100	14	14 / 14	100





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* 09.2007

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

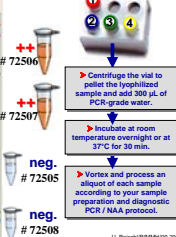
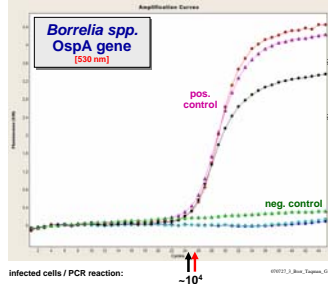
Group B

Reischl / Lehn / Wolf

- 1 72505
- 2 72508
- 3 72507 25.18
- 4 72506 24.95
- 5 pos.Kon. Bor 24.53
- 6 neg.Kon.



LightCycler PCR protocol, unpublished in house protocol.



Centrifuge the vial to pellet the lysophilized sample and add 300 µl 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/IMA/109.2007



INSTAND-E12_II07