



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

Dear Participant, dear Colleague,

*Please find **a brief discussion of the current results in English** after the section in German language. As always, result tables are depicted 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. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

MAI 2009:

Highlights der aktuellen Ringversuchsrunde waren zweifelsohne der RV 531 (*Chlamydia trachomatis*), der diesmal auch ein Isolat der viel diskutierten **schwedischen C. trachomatis Mutante** enthielt, sowie der RV 539 (MRSA), bei dem ein "heimisches" **MRSA-Isolat mit ungewöhnlicher SCCmec Integrationsstelle** versandt wurde. Aber dazu später mehr.

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 # 91001), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 91502, # 91503), *Chlamydia pneumoniae* (Probe # 91414), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 91424). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 91104 dieser Ringversuchsrunde. 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 10- bis 50-fache der unteren Nachweisgrenze durchschnittlich sensitiver PCR-Protokolle unter Standardbedingungen (50 µl Block-Cycler Reaktionsansätze, 35 PCR-Zyklen, ggf. entsprechende *real-time* PCR Protokolle; 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 prozentualen 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 erneut 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 539: MRSA

Zuerst einmal, wie gehabt, eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für den **Direktnachweis von MRSA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise Nasenabstrichen) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen an entsprechenden Zielorganismen. Für interessierte Teilnehmer soll an dieser Stelle noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, daß sich mit Testsystemen, die üblicherweise für die Kulturbestätigung von *S. aureus* und/oder MRSA ausgelegt sind, diese geringen Mengen nicht immer zuverlässig nachweisen lassen werden. Eine Teilnahme an diesem Ringversuch ist daher nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Wie im Rahmen dieser Ringversuchsdiskussion schon mehrfach ausgeführt, gewinnt der molekularbiologische Direktnachweis von MRSA im Umfeld der medizinischen Mikrobiologie zunehmend an Attraktivität. Aktuell sind bereits von 6 namhaften Herstellern NAT-gestützte Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar oder befinden sich gerade im Stadium der Zulassung. Deren Verwendung wird im Zuge dieses Ringversuchs auch systematisch abgefragt. Die Auswertung der aktuellen Ergebnisse zeigt erneut die spezifischen Limitationen der unterschiedlichen Testformate und -konzepte. Bedingt durch die diagnostische Fragestellung bestehen die spezifischen Anforderungen hier in einem möglichst sensitiven Nachweis von geringsten Mengen an Zielorganismen und gleichzeitig in der differenzierten Erfassung von *mecA*-positiven Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies.

Einige der derzeit etablierten eigenentwickelten oder kommerziellen Testsysteme zum Direktnachweis von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial basieren auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern, Staphylokokkenspezies-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen in der entsprechenden Nukleinsäurepräparation. Da sowohl bei *S. aureus* als auch bei Koagulase-negativen Staphylokokken das *mecA*-Gen für die phänotypische Ausprägung einer Methicillin-Resistenz verantwortlich ist, ist die Aussagekraft dieser PCR-gestützten Testsysteme für den Direktnachweis von MRSA aus nativem Patientenmaterial eingeschränkt, wenn beim Patienten eine gleichzeitige Besiedelung mit *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. SCC*mec*-basierte PCR Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCC*mec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec* Kassette im *S. aureus* Genom als Zielsequenz verwenden. Eine Diskussion dieser Problematik findet sich beispielsweise in: Kola et al., "Workshop zum MRSA-Screening am 25.05.05 in Hannover", Mikrobiologe, 2005, 175-181, sowie in Form einer Übersichtsarbeit aus unserem Hause in der Zeitschrift *Laboratoriumsmedizin*. (J. Lab. Med., 2008, **32**:253-265).

Daß aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandenen *mecA*-Gens versandt. Da wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben, primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzutesten, befand sich im aktuellen Ringversuch wieder einmal eine Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken, ein Patientenisolat eines typischen *community acquired* (CA)-MRSA Stammes, sowie ein lokales MRSA Patientenisolat mit einer wohl eher ungewöhnlichen SCC*mec-orfX* Region. Als Beleg für die Tatsache, daß es sich bei diesem "interessanten" MRSA Isolat definitiv nicht um einen der zahlreichen "exotischen" MRSA Stämme handelt, mit denen man in

Europa äußerst selten konfrontiert wird und mit dem der Ringversuchsleiter die Teilnehmer bzw. die Hersteller bestimmter kommerzieller Testsysteme trefflich ärgern (bzw. verärgern) könnte, hier der entsprechende **Fallbericht von Kollegen Dr. Thomas Holzmann** (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Regensburg):

Das besagte MRSA Isolat stammt von einem intraoperativen Abstrich aus dem Schultergelenk eines 45-jährigen männlichen Patienten. Der Patient hatte sich mit starken Schulterschmerzen in der Notaufnahme eines peripheren Krankenhauses vorgestellt. Dort wurde eine Infiltration des Gelenkes mit Lokalanästhetika durchgeführt. Am folgenden Tag stellte sich der Patient erneut mit stärksten Schmerzen und Fieber vor. Intraoperativ fand sich nun ein ausgeprägtes Gelenksempyem. In den folgenden Stunden wurde der Patient kreislaufinstabil und deshalb intensivpflichtig. Im weiteren Verlauf musste der Patient aufgrund einer massiven Verschlechterung der Beatmungs- und Kreislaufsituation in die Universitätsklinik übernommen werden, wo das komplette Spektrum intensivmedizinischer Verfahren (ECMO, Hochfrequenzbeatmung, NO-Beatmung etc.) eingesetzt wurde. Der Patient verstarb trotz aller Maßnahmen vier Tage nach Aufnahme bei einem ausgeprägten Gerinnungsversagen im Multiorganversagen. In der Anamnese des Patienten fanden sich außer einer chronisch rezidivierenden Pankreatitis äthyltoxischer Genese keine weiteren Grundkrankheiten, die den rapiden Verlauf der Erkrankung erklären könnten. Tragischerweise hatte der Patient einige Jahre zuvor eine Messerstichverletzung am Herz mit Eröffnung des rechten Ventrikels überlebt und daraufhin seine Lebensumstände geordnet und dem Alkohol entsagt. Bei dem angezüchteten Stamm handelt es sich um einen Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) mit positivem PCR-Nachweis des *lukS/F-PV* Gens. Die molekulare Feintypisierung ergab einen *spa*-Typ t657.

Dies nur als Beleg für die Tatsache daß jeder Ringversuchsteilnehmer diesem Isolat beim routinemäßigen NAT-gestützten MRSA Scening begegnen könnte – und wenn im Rahmen des Aufnahmescreenings nicht parallel der traditionelle Kulturnachweis durchgeführt wird, dann würde dieses MRSA Isolat vermutlich unerkannt "durchrutschen".

Aber nun zurück zur Diskussion der Ringversuchsergebnisse. Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt Probe # 91901 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge dieses ungewöhnlichen Methicillin-resistenten *S. aureus* Patientenisolats (CA-MRSA, PVL-positiv, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/mL, *spa*-Typ t657). Probe # 91902 enthielt ein Gemisch aus einem *S. aureus* Isolat (MSSA, PVL-negativ, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-positiv, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Die Probe # 91903 enthielt diesmal eine relativ hohe Menge eines typischen CA-MRSA Isolats (*S. aureus*, *mecA*-positiv, PVL-positiv, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml, *spa*-Typ t310) und die letzte der 4 Proben enthielt keine Staphylokokken (# 91904; *E. coli*).

Für die stark positive Probe # 91903 wurden von fast allen der insgesamt 163 Teilnehmer durchwegs korrekte Resultate mitgeteilt (siehe Tabelle 2). Angesichts der relativ hohen Menge an Zielorganismen kann die Mitteilung eines falsch-negativen Ergebnisses bei dieser Probe nicht mit mangelnder Sensitivität entschuldigt werden. Selbst wenn das entsprechende Zertifikat erteilt werden sollte (ein falsches Ergebnis bei den 4 Einzelproben wird ja bekanntermaßen toleriert), so sollten die 5 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis bei Probe # 91903 diesen Ringversuch zum Anlaß nehmen, um die Auswahl ihres Testsystems zu hinterfragen und die Funktionalität ihrer Testkomponenten sicherzustellen.

Die negative Probe # 91904 wurde nahezu von allen Teilnehmern korrekt befundet. Den 4 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis ist jedoch anzuraten, den workflow ihres jeweiligen Testsystems sicherheitshalber auf mögliche Verschleppung von hochpositivem Probenmaterial während der Probenaufarbeitung oder während der Komplettierung entsprechender NAT-Reaktionsansätze abzuprüfen.

Auch für die Probe # 91902 mit MSSA und *mecA*-positivem *S. epidermidis* wurde von der Mehrzahl der Teilnehmer ein richtig negatives Ergebnis berichtet. Interessanterweise wurden bei

dieser Probenkonstellation mit eigenentwickelten oder kommerziellen Testsystemen, die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruhen, auch diesmal wieder relativ hohe Richtigkeitsquoten beobachtet. Da mit diesen Testsystemen zwar die Anwesenheit des *mecA* Gens nachgewiesen werden kann, dessen Herkunft aber nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden kann, wäre in diesem Fall "fraglich" das wissenschaftlich korrekte Ergebnis der NAT-gestützten Untersuchung. Unter den 12 als "fraglich" klassifizierten Ergebnissen für Probe # 91902 befinden sich daher auch 3 der insgesamt 5 Teilnehmer mit dem kommerziellen Hyplex StaphyloResist Testsystem sowie 8 Teilnehmer mit eigenentwickelten (*in house*) Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen. Die 21 Teilnehmer, die diese Probe als "positiv" bewertet haben, sollten jedoch die Spezifität ihrer Testsysteme überprüfen oder sich hinsichtlich der Befunderstellung deren technische Limitationen bewußt machen.

Im Vergleich zu den 3 anderen Proben gestaltet sich die Ergebnislage für Probe # 91901, die eine nennenswerte Menge eines MRSA Patientenisolats mit einer wohl eher ungewöhnlichen *SCCmec-orfX* Region enthielt, erwartungsgemäß etwas komplexer. Mit der zunehmenden Implementierung von schnellen und möglichst zuverlässigen NAT-gestützten Verfahren zum MRSA Direktnachweis sind inzwischen eine Vielzahl mehr oder weniger gut evaluierter *in-house* Testkonzepte sowie einige kommerzielle Testsysteme namhafter Diagnostikfirmen verfügbar, die auf dem gezielten Nachweis einer integrierten *SCCmec*-Kassette im *S. aureus* Genom beruhen. Um eine möglichst breite Abdeckung der unterschiedlichen *SCCmec* Kassettentypen zu erreichen, muß hier im Rahmen eines Multiplex-PCR Ansatzes mit einer relativ komplexen Mischung unterschiedlicher Primer- und Sondensequenzen gearbeitet werden, wobei die resultierende Sensitivität und Spezifität maßgeblich von der Auswahl der einzelnen Primersequenzen und deren Positionierung um die Integrationsstelle der jeweiligen *SCCmec* Kassette herum bestimmt wird. Die Vorteile dieser Zielsequenz sind unumstritten – aber aufgrund der Multiplex-Problematik müssen im Rahmen der Testentwicklung gewisse Abstriche hinsichtlich der Abdeckung unterschiedlicher Sequenzvarianten gemacht werden, um unter dem Strich auch noch eine ausreichend gute Sensitivität und Spezifität zu erreichen. Daher fallen zwangsläufig einige der gemeinhin als selten oder exotisch betrachteten Sequenzvarianten durch das Raster. Angesichts des zuvor dargestellten Fallberichts möchte ich es jedoch den Teilnehmern dieses Ringversuchs überlassen zu bewerten, ob dieser von einem einheimischen Patienten ohne spektakuläre Auslandsanamnese isolierte MRSA Stamm wirklich zu den Exoten gezählt werden sollte. Es bleibt wohl unbestritten, daß ein fehlender Nachweis schwerwiegende Konsequenzen für den betroffenen Patienten, aber auch für mögliche Kontaktpatienten nach sich ziehen kann. Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 91901 differenziert betrachtet, dann wird schnell deutlich, welche der derzeit verfügbaren kommerziellen Testsysteme diesen MRSA Stamm offensichtlich nicht erfassen: BD GeneOhm MRSA (0 von 35 Teilnehmern), Hain Lifescience GT MRSA Direct / GQ MRSA (8 von 44 Teilnehmern), Cepheid XpertMRSA / GeneXpert (21 von 21 Teilnehmern), Roche LightCycler MRSA Advanced Test (1 von 4 Teilnehmern) und *in-house* PCR Assays mit *SCCmec* als angegebener Zielsequenz (3 von 18 Teilnehmern). Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die besagte Probe # 91901 fairerweise nicht als "falsch-negativ" bewertet.

Um im Rahmen unserer Ringversuchsaktivitäten auch einen indirekten Beitrag "zur Verbesserung der Diagnostik" leisten zu können, stellt der Ringversuchsleiter das entsprechende MRSA Isolat interessierten Kollegen auf Anfrage gerne zur Verfügung.

Insgesamt betrachtet spricht die Ergebnislage dennoch für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Für Kollegen, die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Spezifität und Sensitivität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit den Proben dieses Ringversuchs

wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen dieser Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors PVL (Panton-Valentine Leukozydin) bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 49 der insgesamt 163 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und bei 44 Teilnehmern waren die Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchwegs korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise unter: Linde, H.J. und N. Lehn (2005) Dtsch. Med. Wochenschr. 130:2397-2401, oder Witte, W. et al. (2005) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24:1-5. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus* Isolaten findet sich beispielsweise in: Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. (2007) **26**:131-135.

Brief discussion in ENGLISH:

RV 539: MRSA

The concept of this proficiency testing series is designed to determine the analytical sensitivity and specificity of NAT-based assays for the direct detection of MRSA and/or community acquired (CA)-MRSA DNA in typical sample material. With the development and composition of the corresponding sample materials we want to mimic the situation of processing clinical samples like wound or nasal swabs. So the lyophilized samples usually contain low amounts of target organisms in a natural background of human cells and other components. Here it is important to note that NAT assays designed for MRSA culture confirmation purposes may fail due to the low number of MRSA organisms in individual samples of the QC set.

To evaluate the analytical specificity of the MRSA-specific test systems, the current set contained a typical CA-MRSA isolate, a mixture of coagulase-negative staphylococci and *S. aureus*, as well as an "atypical but not exotic" CA-MRSA strain grown from a German patient at the University hospital of Regensburg.

Sample # 91902 of the current set contained a mixture of *S. aureus* (MSSA, PVL-negative, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Correct (negative) results were reported by 130 of the 163 participating laboratories. Most of the participants who reported "questionable" for sample # 91902 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene (where "questionable" is the expected and correct classification for this mixed sample). One sample of the current set (# 91904) contained no target organisms but only *E. coli* cells. For this sample, negative results were reported by 158 of the 163 participants. Laboratories who have reported a positive MRSA result should check their workflow for contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection.

Sample # 91903 contained a relatively high number of CA-MRSA organisms (*S. aureus*, *mecA*-positive, PVL-positive, *spa*-type t310, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml). With the exception of 5 participants, this sample was tested positive by the MRSA-specific NAT assays at all participating laboratories. Sample # 91901 contained a significant number of cells of an "atypical" CA-MRSA strain (MRSA, PVL-positive, *spa* type t657, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), isolated from a German patient who was submitted to our university hospital. Due to some uncommon sequence variations within the SCC*mec*-orfX junction, the latter organism was missed by a number of *in-house* PCR assays and by most of the commercial SCC*mec*-based assay concepts. In order to illustrate the individual performance of the assays, here are the number of true positive results for MRSA sample # 91901 by indicated SCC*mec*-based test systems: BD GeneOhm MRSA (0 of 35 participants), Hain Lifescience GT MRSA Direct / GQ MRSA (8 of 44 participants), Cepheid XpertMRSA / GeneXpert (21 of 21

participants), Roche LightCycler MRSA Advanced Test (1 of 4 participants) and some *in-house* PCR assays using *SCCmec* as diagnostic target sequence (3 of 18 participants).

Since this weird MRSA strain is certainly not listed among the prevalent epidemiologic MRSA isolates in Europe, we have not scored a negative result for the latter sample in the course of issuing the official QC certificates. However, the corresponding CA-MRSA strain is available from the ring trial coordinator Dr. U. Reischl upon request.

Except the issue with the MRSA strain in sample # 91901, there were no noticeable problems with the current set of QC samples and most of the applied MRSA-specific PCR assays have shown a very good overall diagnostic performance on samples # 91902 to # 91904.

Molecular detection of the *lukF/S-PV* gene was performed by 49 of the 163 participating laboratories – 44 laboratories correctly classified the strains in samples # 91901 and # 91903 as PVL positives.

PCR-/NAT MRSA / cMRSA (RV 539) Mai 2009



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
91901	++	61 /71, 72	cMRSA spa t657 (<i>S. aureus</i> , oxa ^K , PVL-pos) (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
91902	∅	62 /72, 73	MSSA + CoNS (<i>S. epidermidis</i> ; oxa ^R)(~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
91903	++	61 /71, 72	cMRSA spa t310 (<i>S. aureus</i> , oxa ^K , PVL-pos) (~ 1x10 ⁶ CFU/mL)
91904	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 163	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	91901	91902	91903	91904	91901	91902	91903	91904	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	65 ¹⁾	21	158 ¹⁾	4	n.d.	2	2	2	2
Negativ	93	130	5	158	nein no	161	161	161	160
Fraglich <i>Questionable</i>	5	12	0	1	ja yes	0	0	0	1

Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwenden 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>	%
BD GeneOhm MRSA [20] (n=35)	38	38 / 69 §	55	70	70 / 70	100
GenoType MRSA Direct [21] (n=44)	50	50 / 88	57	86	86 / 86 §	100
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=5)	9	9 / 9 §	100	7	7 / 7 §	100
LightCycler Kits [23] (n=9)	16	16 / 18	89	12	12 / 16 §	75
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=21)	40	40 / 42	95	41	41 / 42	98
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=4)	5	5 / 8	63	8	8 / 8	100
Commercial assay kit [27] (n=13)	21	21 / 26	81	18	18 / 25 §	72
<i>In house</i> PCR assay [28] (n=44)	62	62 / 84 §	74	69	69 / 83 §	83
Andere / k.A. / other [29] (n=4)	6	6 / 7 §	86	7	7 / 7 §	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: ¹⁾ cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 49 laboratories. 44 of them reported correct results for the two CA MRSA-positive samples.



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>



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

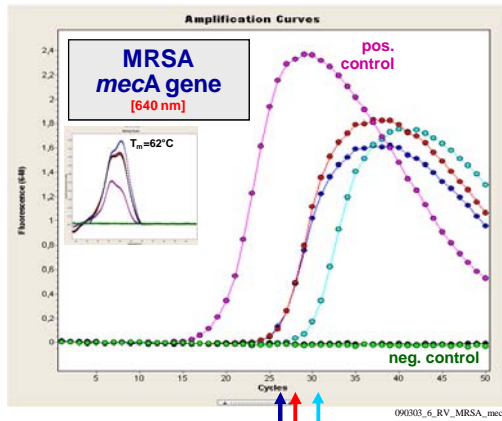
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

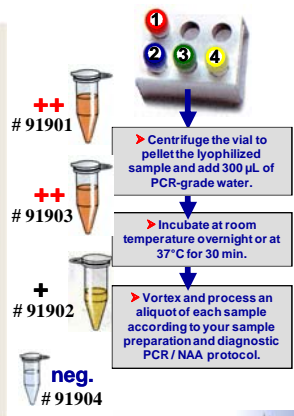
✓	1	91901	24,76
✓	2	91902	28,90
✓	3	91903	24,97
✓	4	91904	
✓	5	pos. Control mecA	18,71
✓	6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., H.-J. Linde, B. Leppmeier, N. Lehn, (2001). Duplex LightCycler PCR Assay for the rapid detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ $\sim 10^3$



INSTAND-I03_I/09



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>



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

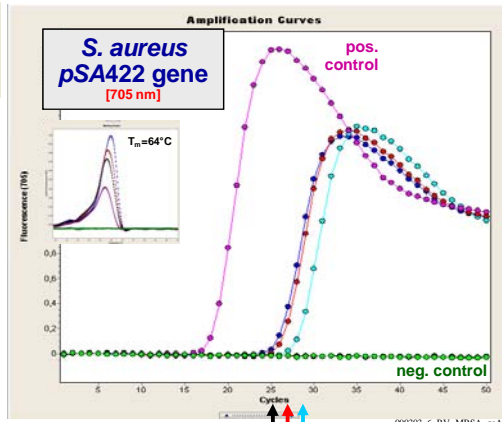
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

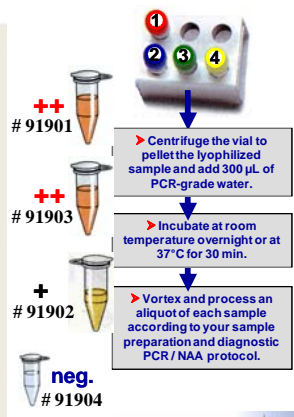
✓	7	91901	24,33
✓	8	91902	25,56
✓	9	91903	24,78
✓	10	91904	
✓	11	pos. Control psA42	16,71
✓	12	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Reischl, U., H.-J. Linde, B. Leppmeier, N. Lehn, (2001). Duplex LightCycler PCR Assay for the rapid detection of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^4$ $\sim 10^3$



INSTAND-I04_I/09



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

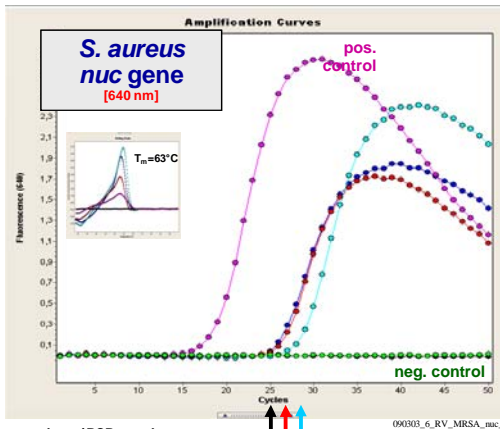
➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

✓	13	91901	24,77
✓	14	91902	27,50
✓	15	91903	25,06
✓	16	91904	
✓	17	pos. Control nuc	17,70
✓	18	NTC	

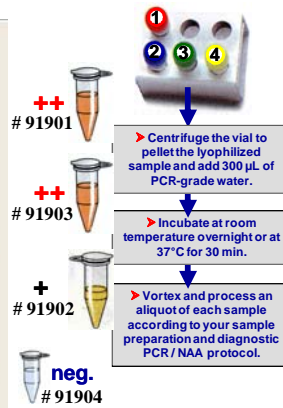


LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol
 (Reischl, U., Regensburg).



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^4$ $\sim 10^3$



INSTAND-I05_I/09



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

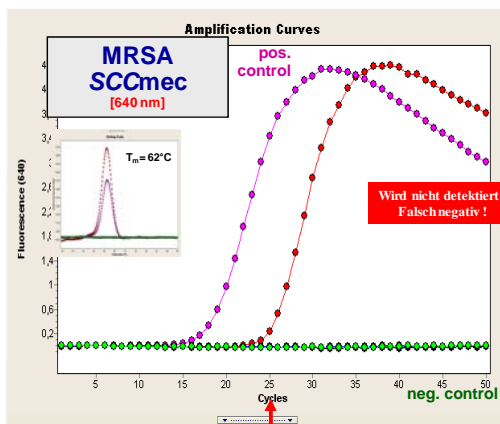
➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

✓	25	91901	
✓	26	91902	
✓	27	91903	24,28
✓	28	91904	
✓	29	pos. Control scc	17,52
✓	30	NTC	

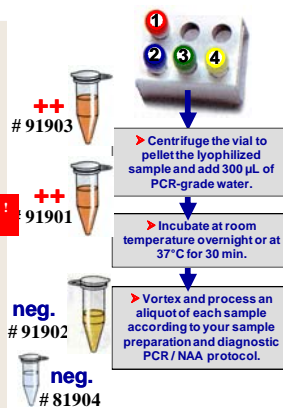


LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol
 (Reischl, U., Regensburg).



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^4$



INSTAND-I06_I/09



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

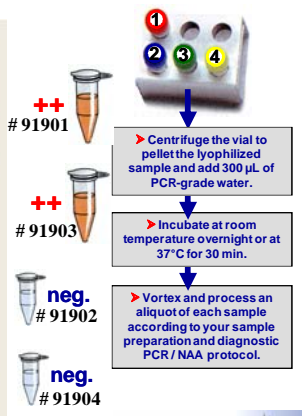
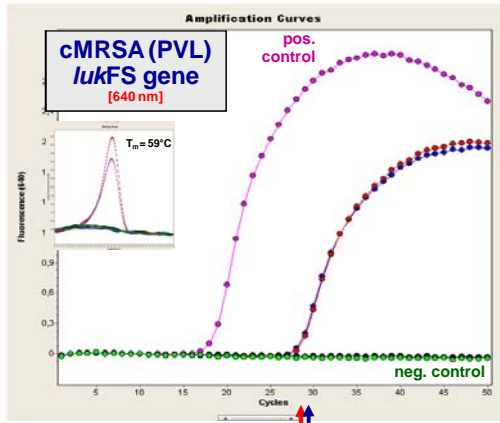
➤ **Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

✓	19	91901	26,68
✓	20	91902	26,68
✓	21	91903	26,68
✓	22	91904	16,78
✓	23	pos. Control luk	16,78
✓	24	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 unpublished in house protocol
 (Reischl, U., Regensburg).



INSTAND-I07_I/09

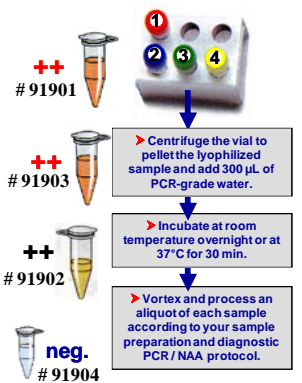
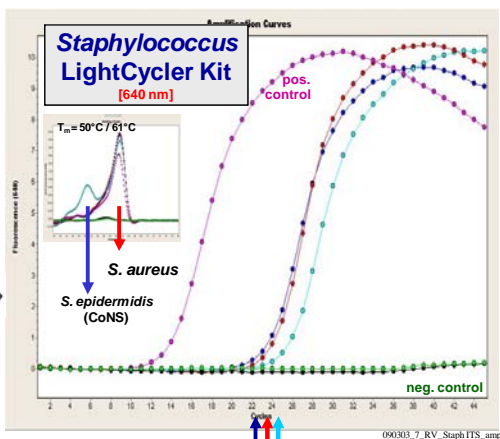
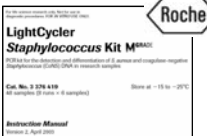


539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

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

Reischl / Linde / Wolf

✓	7	91901	23,79
✓	8	91902	25,97
✓	9	91903	24,27
✓	10	91904	
✓	11	pos. Ko. Staph Roche	14,21
✓	12	NTC	



INSTAND-I 08_I/09



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>



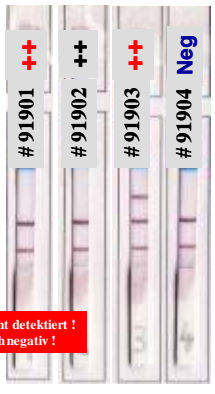
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

➤ Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Linde / Wolf

**GenoQuick MRSA
 VER ß 2.0**

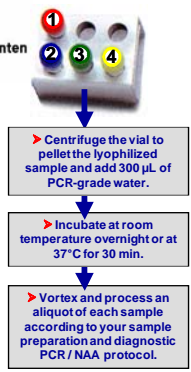
GenoQuick® MRSA
 ß-Version – nur für Leistungsbewertungszwecke
 Molekulargenetisches Testsystem zum Direktnachweis von Methicillin-resistenten
Staphylococcus aureus (MRSA)-Stämmen aus Patientenproben



← MRSA
 ← Amplifikationskontrolle (AC)
 ← Konjugatkontrolle (CC)

Wird nicht detektiert!
 Falsch negativ!

**HAIN
 LIFESCIENCE**
 Hain Lifescience GmbH
 Hardwiesenstraße 1, 72147 Nehren, Germany
<http://www.hain-lifescience.de>



INSTAND-I09_I/09

Hain_MRSA



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>

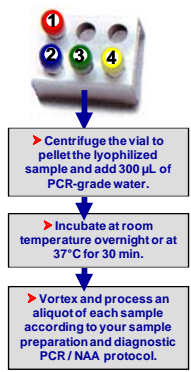
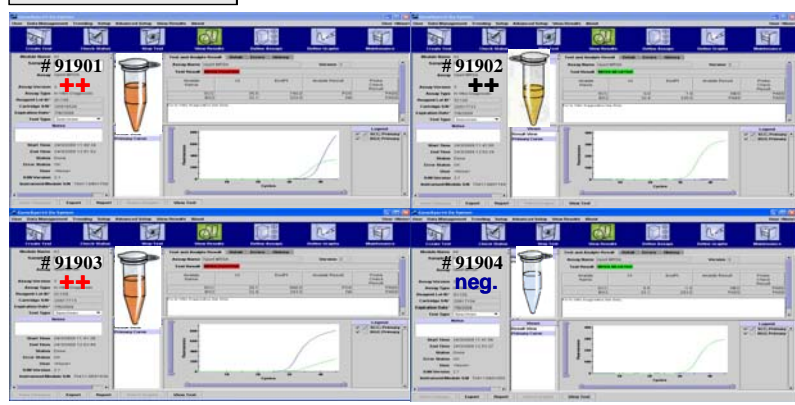


539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

➤ Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Linde / Wolf

Xpert™ MRSA



INSTAND-I10_I/09

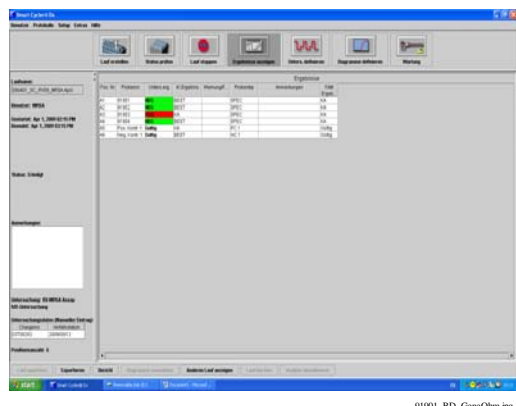
91901_GeneExpert.jpg



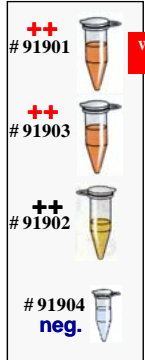
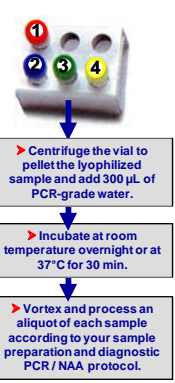
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

➤ **Evaluation (commercial PCR assay):**

BD GeneOhm MRSA Test



Reischl / Linde / Wolf



Wird nicht detektiert!
Falsch negativ!



INSTAND-I11_1/09

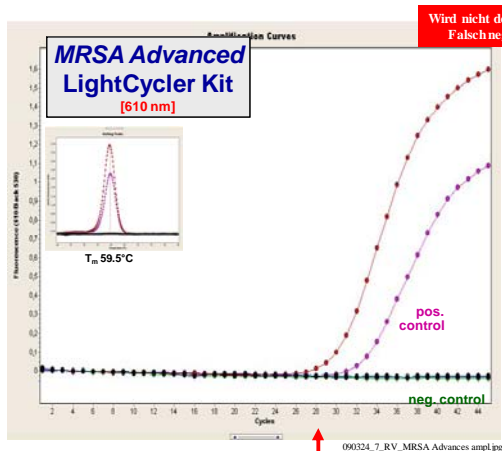
91901_BD_GeneOhm.jpg



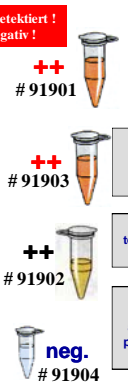
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 05.2009

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

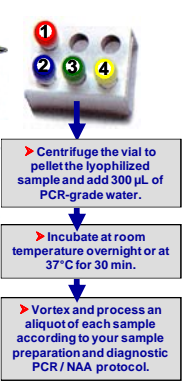
In...	C...	P...	Name	CP
✓	1	HPCH		31,79
✓	2	HNCH		
✓	3	91901		
✓	4	91902		
✓	5	91903		29,27
✓	6	91904		



Wird nicht detektiert!
Falsch negativ!



Reischl / Linde / Wolf



INSTAND-I 12_1/09

090324_7_RV_MRSA_Advances_amp.jpg

U. Reischl/RMM/H09.2009