



**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 15 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**

### AKTUELLE HINWEISE:

Nach dem sehr erfolgreichen Verlauf der initialen "Probe-Ringversuche" wurden 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 vom Universitätsklinikum Salzburg, der hier auch als Ringversuchsleiter fungiert.

Ab der aktuellen Ringversuchsreihe zum "Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken" werden die einzelnen Ringversuche bei INSTAND e.V. aus organisatorischen Gründen jetzt der 500er-Nummerngruppe zugeordnet. Die entsprechenden Ringversuchsnummern (ehemals RV 430 bis RV 438) ändern sich dann wie folgt: RV 430 > RV 530; RV 431 > RV 531; u.s.w. Wir bitten dies bei der Anmeldung zu beachten.

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### APRIL 2006:

Nachdem in einigen der vorhergegangenen Runden dieser Ringversuchs-Serie vorwiegend Proben mit relativ hoher Keimzahl versandt wurden, wird bei der Konzeption des aktuellen und der zukünftigen Ringversuche zum Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT) bei einigen Zielorganismen auch der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, daß zahlreiche Rückstell-Probensätze der früheren Ringversuche noch 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 u.a. 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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

## RV 539: MRSA

Aufgrund zahlreicher Anfragen **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.

Der NAT-gestützte Direktnachweis von MRSA gewinnt im Umfeld der medizinischen Mikrobiologie zunehmend an Aktualität und Attraktivität und es sind bereits einige Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar. Deren Verwendung wurde im Zuge dieses Ringversuchs systematisch abgefragt. Wie bereits im vorhergegangenen "Probe-Ringversuch", so zeigt auch die Auswertung der aktuellen Ergebnisse auf eindrucksvolle Weise 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.

Optional wird im Rahmen dieses neuen Ringversuchs auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenesefaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen codierende Gene *lukF/S* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden in Gruppe A von 14 der 47 teilnehmenden Laboratorien und in Gruppe B von 9 der 38 Ringversuchsteilnehmer mitgeteilt - und diese waren erfreulicherweise durchwegs korrekt.

Nähere Informationen zu der aktuellen 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.

Da sich für diesen neu ins Programm aufgenommenen Ringversuch überraschenderweise mehr als 80 Teilnehmer angemeldet hatten, mussten wir auch Probensets versenden, die ursprünglich für den Herbst-Ringversuch vorgesehen waren. Daher erfolgt die Auswertung diesmal differenziert nach den beiden Gruppen A und B.

### **Auswertung Gruppe A (Probennummern # 61901 bis # 61904):**

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal je eine Probe mit relativ hoher Menge an PVL-positiven MRSA (# 61903; MRSA, PVL-positiv,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), eine Probe mit einem PVL-negativen MRSA Isolat (# 61902; MRSA, PVL-negativ,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml) und der gleichzeitigen Anwesenheit einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. pasteurii*; *mecA*-negativ), eine Probe mit einem *mecA*-negativen *S. aureus* Isolats und der gleichzeitigen Anwesenheit eines *mecA*-positiven *S. epidermidis* Stammes (# 61904; je  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), sowie eine Probe ohne Staphylokokken (# 61901; *E. coli*).

Bis auf ein "fragliches" und 3 falsch-negative Ergebnisse für Probe # 61903 wurden von den insgesamt 47 Teilnehmern durchwegs korrekte Ergebnisse für die beiden positiven Proben sowie für die negative Probe # 61901 mitgeteilt. Auch mit eigenentwickelten oder kommerziellen Testsystemen die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruhen, wurden diesmal sehr hohe Richtigkeitsquoten für Probe # 61902 (MRSA und *S. pasteurii*) beobachtet. Angesichts der bekannten Limitationen solcher Testkonzepte bei der gleichzeitigen Anwesenheit von MRSA / MSSA und CoNS (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) im Probenmaterial erklärt sich die hohe Richtigkeitsquote der

Ringversuchsergebnisse wohl hauptsächlich durch die Auswahl eines *mecA*-negativen Isolats von *S. pasteurii*.

Aber auch die SCC<sub>mec</sub>-basierten Testkonzepte haben gewisse Limitationen. Dies wird im Rahmen des aktuellen Ringversuchs auf eindrucksvolle (und zugegebenermaßen auch etwas "gemeine") Weise mit der Probe # 61904 aufgezeigt. Das hier versandte MSSA Isolat besitzt zwar eine an den jeweiligen Enden intakte SCC<sub>mec</sub> Kasette aber das typischerweise innerhalb der SCC<sub>mec</sub> Kasette vorhandene *mecA*-Gen ist hier deletiert. Aufgrund des zumindest derzeit noch sehr seltenen Vorkommens solcher MSSA Isolate wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 61904 nicht als "falsch-negativ" bewertet. Um auch das Ergebnis der statistischen Auswertung in Tabelle 3 nicht ungerechtfertigterweise zu verfälschen wurden bei der Ermittlung von Richtigkeitsquoten lediglich die Ergebnisse für die Proben # 61901 bis # 61903 berücksichtigt. Nach wie vor scheinen hier die SCC<sub>mec</sub>-basierten Testkonzepte einen gewissen Vorteil gegenüber Testsystemen mit einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen zu besitzen. Für Kollegen die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität und Spezifität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind stehen hiermit wiederum standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

**PCR-/NAT MRSA / cMRSA  
 (RV 539) April 2006, Group A**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
61901	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
61902	++	61 /72,76	MRSA <b>SSC<sub>mec</sub> Typ</b> + CoNS ( <i>S. pasteurii</i> ; oxa <sup>S</sup> ) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
61903	+	61 /72,71	MRSA <b>SSC<sub>mec</sub> Typ</b> (PVL-pos.) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) MLST:152; spa: t355
61904	++	62 /72, 73	<i>S. aureus</i> + CoNS ( <i>S. epidermidis</i> ; oxa <sup>R</sup> )(~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)

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

n = 47	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	61901	61902	61903	61904		61291	61902	61903	61904
Befund Result									
Positiv	0	47	43	38 **)	n.d.	1	1	1	1
Negativ	47	0	3	1	nein no	46	46	46	46
Fraglich Questionable	0	0	1	8	ja yes	0	0	0	0

**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>	%
<i>In house</i> PCR assay [28] (n = 13)	24	24 / 26	92	14 <sup>**</sup> )	14 / 24	58 <sup>**</sup> )
IDI-MRSA (GeneOhm) [20] (n = 3)	5	5 / 5	100	3 <sup>**</sup> )	3 / 6	50 <sup>**</sup> )
GenoType MRSA Direct [21] (n = 20)	40	40 / 40	100	20 <sup>**</sup> )	20 / 39	51 <sup>**</sup> )
Hyplex StaphyloResist [22] (n = 3)	6	6 / 6	100	3	3 / 3	100
LightCycler Kits [23] (n = 4)	8	8 / 8	100	4 <sup>**</sup> )	4 / 7	57 <sup>**</sup> )
Commercial assay kit [27] (n = 6)	12	12 / 12	100	6 <sup>**</sup> )	6 / 12	50 <sup>**</sup> )
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	3	3 / 3 <sup>*</sup> )	100	2 <sup>**</sup> )	2 / 4	50 <sup>**</sup> )

\* 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.*

**Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwenden verschiedener Methoden (ohne Probe # 61904).**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods (without considering sample # 61904).*

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 = 13)	35	35 / 37	95	13	13 / 13	100
IDI-MRSA (GeneOhm) [20] (n = 3)	9	9 / 9	100	3	3 / 3	100
GenoType MRSA Direct [21] (n = 20)	59	59 / 59	100	20	20 / 20	100
Hyplex StaphyloResist [22] (n = 3)	6	6 / 6	100	3	3 / 3	100
LightCycler Kits [23] (n = 4)	11	11 / 11	100	4	4 / 4	100
Commercial assay kit [27] (n = 6)	18	18 / 18	100	6	6 / 6	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 2)	5	5 / 5	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.*

**Comments:** <sup>1)</sup> PVL- or CA-MRSA detection was performed by 14 of the 47 participating laboratories. All of the PVL (*lukFS*)-PCR results for MRSA samples 61902 and 61903 were correct.  
<sup>\*\*</sup>) **Sample # 61904:** MSSA containing a *SCCmec* cassette, but the *mecA* gen is deleted !!

### **Auswertung Gruppe B (Probennummern # 62411 bis # 62414):**

Das aktuelle Set an Ringversuchsproben der Teilnehmergruppe B enthielt diesmal je eine Probe mit relativ hoher Menge an PVL-positiven MRSA (# 62901; MRSA, PVL-positiv,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), eine Probe mit einem PVL-negativen MRSA Isolat (# 62902; MRSA, PVL-negativ,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml) und der gleichzeitigen Anwesenheit einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. pasteurii*; *mecA*-negativ), eine Probe mit der gleichzeitigen Anwesenheit eines MRSA Isolats und eines *mecA*-positiven *S. epidermidis* Stammes (# 62903; je  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), sowie eine Probe ohne Staphylokokken (# 62904; *E. coli*).

Wie in Tabelle 2 dargestellt, wurden von den insgesamt 38 Teilnehmern für die negative Probe # 62904 und die beiden positiven Proben # 62902 und # 62903 bis auf ein "fragliches", ein falsch-positives, sowie insgesamt 6 falsch-negative Ergebnisse durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt. Auch mit eigenentwickelten oder kommerziellen Testsystemen die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruhen, wurden diesmal sehr hohe Richtigkeitsquoten für Probe # 62902 (MRSA und *S. pasteurii*) beobachtet. Angesichts der bekannten Limitationen solcher Testkonzepte bei der gleichzeitigen Anwesenheit von MRSA / MSSA und CoNS (die als klinische Isolate zumeist *mecA*-positiv sind) im Probenmaterial erklärt sich die hohe Richtigkeitsquote der Ringversuchsergebnisse wohl hauptsächlich durch die Auswahl eines *mecA*-negativen Isolats von *S. pasteurii*.

Wie schon im vorhergehenden Abschnitt bei den Ringversuchsproben der Teilnehmergruppe A diskutiert, haben auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen. Dies wird im Rahmen des aktuellen Ringversuchs auf eindrucksvolle (und zugegebenermaßen auch etwas "gemeine") Weise mit der Probe # 62903 aufgezeigt. Denn das hier versandte MRSA Isolat besitzt eine SCC*mec* Kasette vom Typ V, deren terminale Nukleinsäuresequenz sich deutlich von den typischerweise anzutreffenden MRSA Isolaten mit SCC*mec* Kassettyp I bis IV unterscheidet. Aufgrund des zumindest derzeit noch sehr seltenen Vorkommens solcher "exotischer" MRSA Isolate wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 62903 nicht als "falsch-negativ" bewertet. Um auch das Ergebnis der statistischen Auswertung in Tabelle 3 nicht ungerechtfertigterweise zu verfälschen, wurden bei der Ermittlung von Richtigkeitsquoten lediglich die Ergebnisse für die drei anderen Proben berücksichtigt. Wie bereits bei der Diskussion der Ergebnisse von Teilnehmergruppe A diskutiert, so scheinen auch hier die SCC*mec*-basierten Testkonzepte einen gewissen analytischen Vorteil gegenüber Testsystemen mit einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen zu besitzen. Für Kollegen die an einer aussagekräftigen Abprüfung der Sensitivität und Spezifität von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind und/oder überprüfen wollen, ob ihr spezifisches Testsystem MRSA mit SCC*mec* Typ V erfassen kann, stehen hiermit standardisierte Rückstellproben zur Verfügung die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

**PCR-/NAT MRSA / cMRSA  
 (RV 539) April 2006, Group B**



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

Gruppe B	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
62901	++	61 / 72,71	MRSA <b>SSCmec Type</b> (PVL-pos.) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) MLST:152; spa: t355
62902	++	61 / 72,76	MRSA <b>SSCmec Type</b> + CoNS ( <i>S. pasteurii</i> ; oxa <sup>S</sup> ) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
62903	++	61 / 72,73	MRSA <b>SSCmec Type V</b> + CoNS ( <i>S. epidermidis</i> ; oxa <sup>R</sup> ) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
62904	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12

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

n = 38	Probennummer (Sample no.)					Inhibition			
	62901	62902	62903	62904		62291	62902	62903	62904
Befund Result									
Positiv	36	34	11 **)	1	n.d.	0	0	0	0
Negativ	2	4	<b>25</b>	36	nein no	38	38	38	37
Fraglich Questionable	0	0	2 #)	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
In house PCR assay [28] (n = 24)	52 **)	52 / 72	72 **)	22	22 / 23	96
IDI-MRSA (GeneOhm) [20] (n = 3)	6 **)	6 / 9	67 **)	3	3 / 3	100
GenoType MRSA Direct [21] (n = 8)	16 **)	16 / 24	67 **)	8	8 / 8	100
Hyplex StaphyloResist [22] (n = 2)	6	6 / 6	100	0 #)	0 / 0	-
LightCycler Kits [23] (n = 2)	5 **)	5 / 6	78 **)	2	2 / 2	100
Commercial assay kit [27] (n = 3)	7 **)	7 / 9	78 **)	3	3 / 3	100
Andere / k.A. / other [29] (n = 1)	1 **)	1 / 3	33 **)	1	1 / 1	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.



**Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwenden verschiedener Methoden (ohne Probe # 62903).**

*Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods (without considering sample # 62903).*

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>	%
<b>In house PCR assay [28] (n = 24)</b>	<b>43</b>	43 / 48	<b>90</b>	<b>46</b>	46 / 47	<b>98</b>
<b>IDI-MRSA (GeneOhm) [20] (n = 3)</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>
<b>GenoType MRSA Direct [21] (n = 8)</b>	<b>16</b>	16 / 16	<b>100</b>	<b>16</b>	16 / 16	<b>100</b>
<b>Hyplex StaphyloResist [22] (n = 2)</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>
<b>LightCycler Kits [23] (n = 2)</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>	<b>4</b>	4 / 4	<b>100</b>
<b>Commercial assay kit [27] (n = 3)</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>	<b>6</b>	6 / 6	<b>100</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 1)</b>	<b>1</b>	1 / 2	<b>50</b>	<b>2</b>	2 / 2	<b>100</b>

\* 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:** <sup>1)</sup> PVL- or CA-MRSA detection was performed by 9 of the 38 participating laboratories. All of the PVL (*lukFS*)-PCR results for MRSA samples 62901, 62902 and 62903 were correct.  
<sup>\*\*)</sup> **Sample # 62903:** MRSA containing a *SCCmec* cassette **type V** !!

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](http://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](http://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**



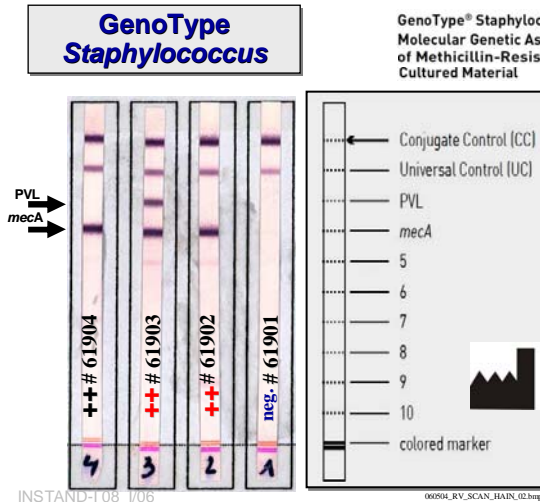
## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

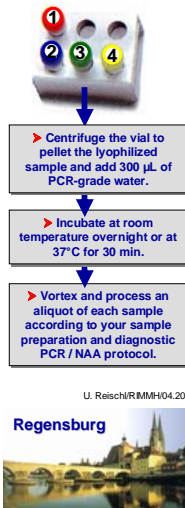
### Evaluation (commercial PCR assay):

### Group A

Reischl / Lehn / Wolf



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



INSTAND-I 08\_I/06

06501\_EV\_SCAN\_HAIN\_02.bmp



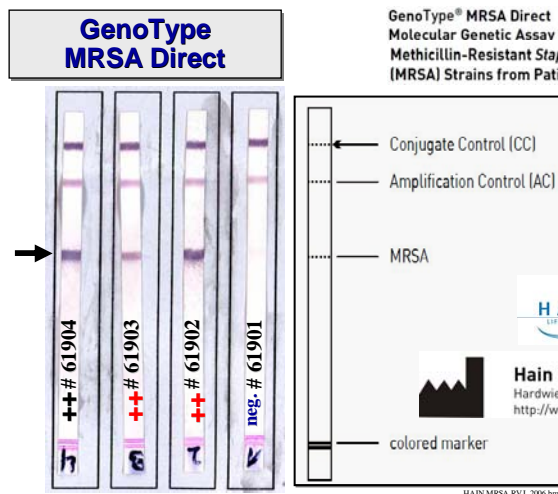
## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

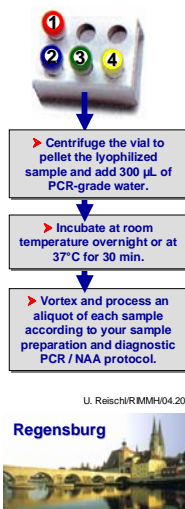
### Evaluation (commercial PCR assay):

### Group A

Reischl / Lehn / Wolf



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



INSTAND-I 09\_I/06

HAIN MRSA RV1 2006.bmp



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

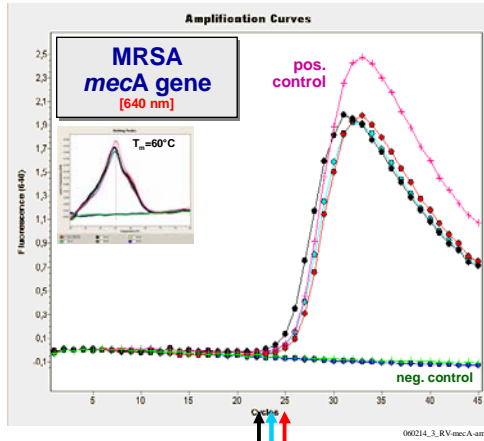
### Group A

Reischl / Lehn / Wolf

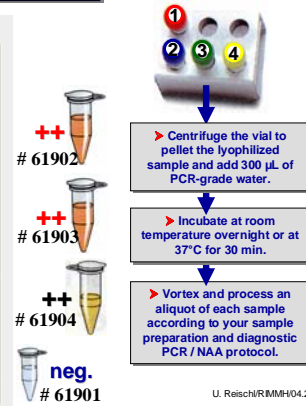
1	61901 RV April mecA	
2	61902	25,43
3	61903	25,71
4	61904	24,62
5	pos.Kon. mecA	25,62
6	neg.Kon.	



**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 simultaneously species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



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



U. Reischl/RMMH-004.2006



INSTAND-I\_03\_I/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

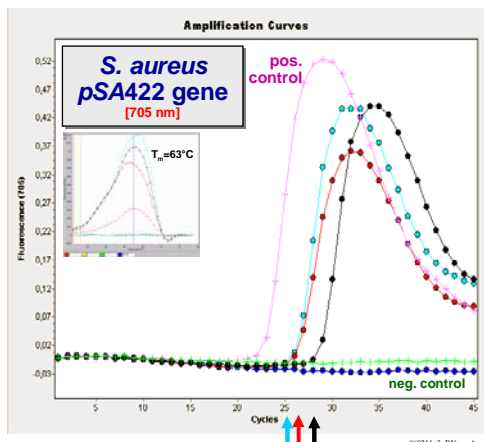
### Group A

Reischl / Lehn / Wolf

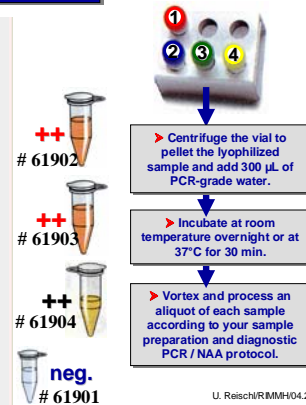
11	61901 RV April pSA	
12	61902	25,24
13	61903	25,51
14	61904	27,78
15	pos.Kon. pSA	21,99
16	neg.Kon.	



**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 simultaneously species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



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



U. Reischl/RMMH-004.2006



INSTAND-I\_04\_I/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>



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

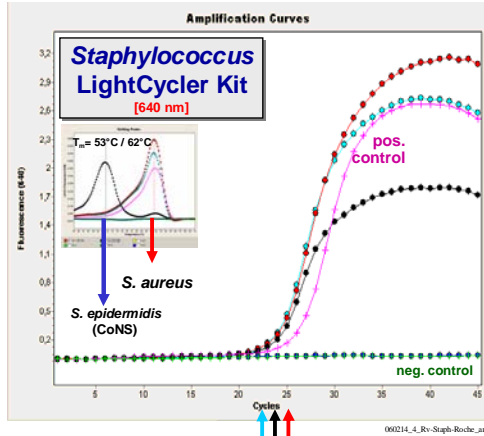
### Group A

Reischl / Lehn / Wolf

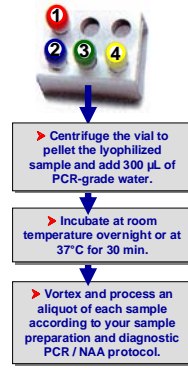
1	61901 RV April Stau Ro	36,94
2	61902	23,82
3	61903	24,15
4	61904	23,59
5	pos.Kon. Stau Roche	26,07
6	neg.Kon.	



LightCycler PCR protocol:  
 LC Staphylococcus Ka  
 Microbiology  
 (Roche Diagnostics)



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



U. Reischl/RMMH-04.2006



INSTAND-I\_05\_I/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>



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

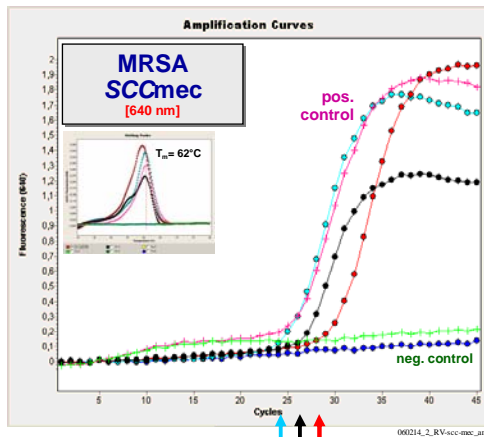
### Group A

Reischl / Lehn / Wolf

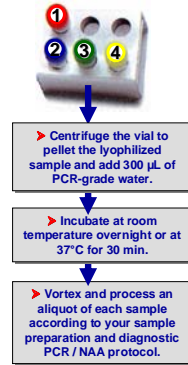
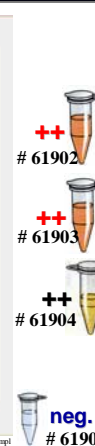
1	61901 RV April Mielhke	25,33
2	61902	30,07
3	61903	26,51
4	61904	26,03
5	pos.Kon. Mielhke	
6	neg.Kon.	



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



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



U. Reischl/RMMH-04.2006



INSTAND-I\_06\_I/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

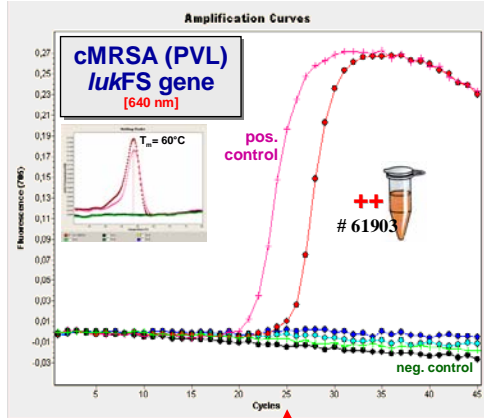
### Group A

Reischl / Lehn / Wolf

21	61901 RV April Luk	
22	61902	
23	61903	24,91
24	61904	
25	pos. Kon. Luk	20,75
26	neg. Kon.	



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



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

- neg. # 61901
- neg. # 61902
- neg. # 61904



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu$ L 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/RMMH#04.2006



INSTAND-I 07\_I/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

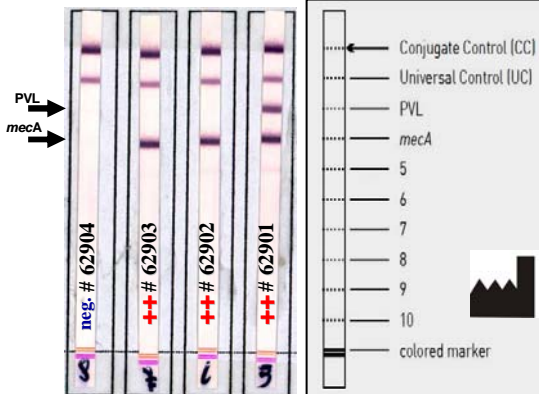
### Evaluation (commercial PCR assay):

### Group B

Reischl / Lehn / Wolf

### GenoType Staphylococcus

GenoType® Staphylococcus  
 Molecular Genetic Assay for Fast Identification  
 of Methicillin-Resistant Staphylococci from  
 Cultured Material



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



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300  $\mu$ L 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/RMMH#04.2006



INSTAND-I 17\_I/06

069504\_RV\_SCAN\_HAIN\_01.hep



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (commercial PCR assay):

### Group B

Reischl / Lehn / Wolf

**GenoType  
MRSA Direct**

GenoType® MRSA Direct  
 Molecular Genetic Assay for the Direct Detection of  
 Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*  
 (MRSA) Strains from Patient Specimens

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

- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized 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/RMMH-04.2006

**Regensburg**

INSTAND-1 18\_L/06

HAIN MRSA RV1 2006.bmp



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

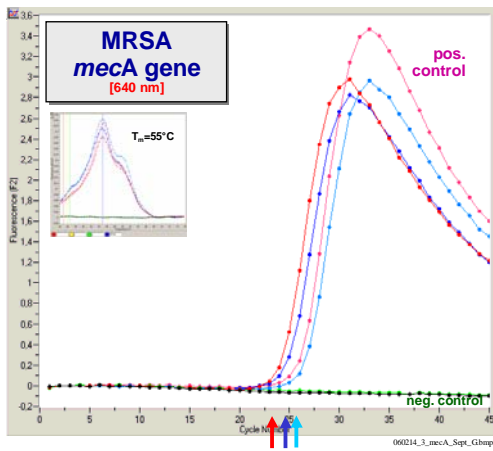
### Group B

Reischl / Lehn / Wolf

5	posKon_mecA	25.65
6	negKon	
7	62901 FW 5ept_mecA	24.22
8	62902	25.93
9	62903	23.57
10	62904	



**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 simultaneously species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



- Centrifuge the vial to pellet the lyophilized 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/RMMH-04.2006



INSTAND-1 12\_L/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

### Group B

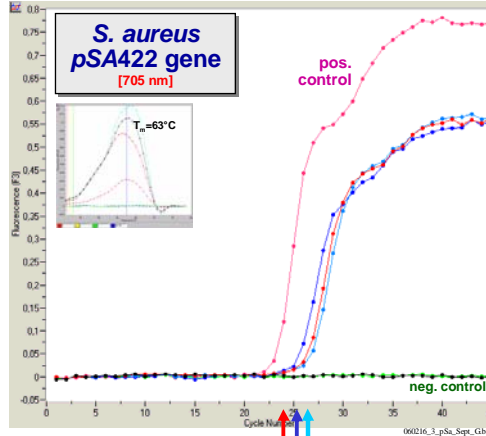
Reischl / Lehn / Wolf

- 5 pos. Kon. pSa 22.12
- 6 neg. Kon. 22.12
- 7 62901 pSa Sept 24.52
- 8 62902 25.83
- 9 62903 25.46
- 10 62904

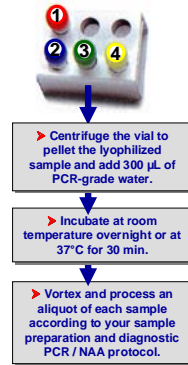
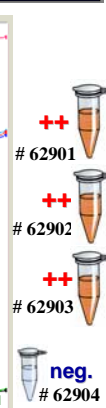


**LightCycler PCR protocol:**

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



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



U. Reischl/RMMH/04.2006



INSTAND-I 13\_I/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

### Group B

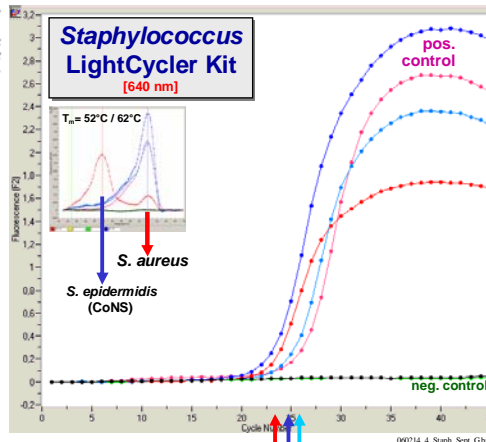
Reischl / Lehn / Wolf

- 5 pos. Kon. Stau Roche 26.07
- 6 neg. Kon. 23.12
- 7 62901 RV Sept 24.82
- 8 62902 22.74
- 9 62903
- 10 62904

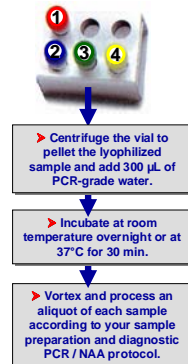
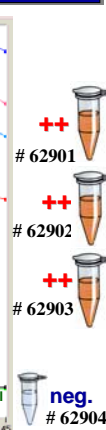


**LightCycler PCR protocol:**

LC Staphylococcus Kit  
 Microbiology  
 (Roche Diagnostics)



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



U. Reischl/RMMH/04.2006



INSTAND-I 14\_I/06





## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

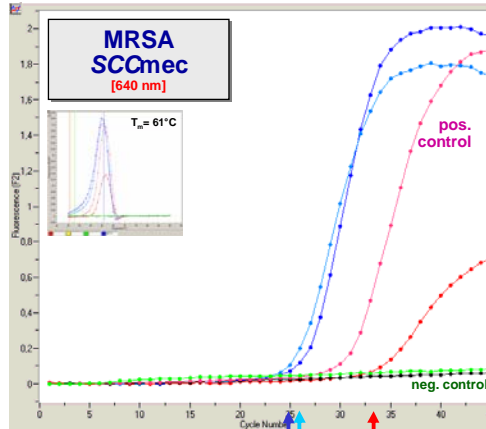
### Group B

Reischl / Lehn / Wolf

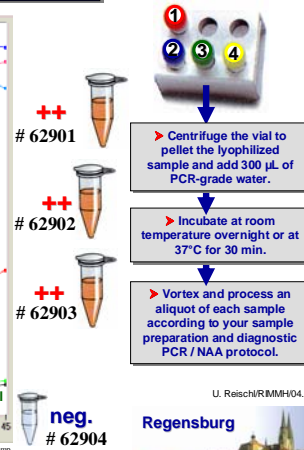
22	RV 62901	26.86
23	RV 62902	25.75
24	RV 62903	34.15
25	RV 62904	
26	pos. Ko Mießke	31.19
27	neg. Ko	



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



organisms / PCR reaction: ~10<sup>3</sup> ~10<sup>3</sup>



U. Reischl/RMMH-04.2006



INSTAND-I 15\_I/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2006

### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

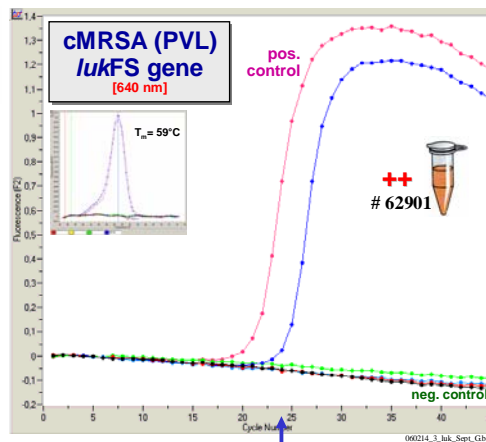
### Group B

Reischl / Lehn / Wolf

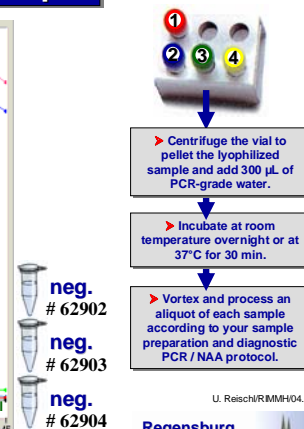
25	pos. Kon. luk	20.76
26	neg. Kon.	
27	62901 RV Sept. luk	23.68
28	62902	
29	62903	
30	62904	



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



organisms / PCR reaction: ~10<sup>3</sup>



U. Reischl/RMMH-04.2006



INSTAND-I 16\_I/06