



Regensburg, den 23.5.2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a brief discussion (NEW !) of the current results in English after the German version on the following pages. As usual, tables with the results are 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 beigegeführten 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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

May 23, 2008

To the participants of the
INSTAND-Proficiency Test in
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 541)

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.instandev.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. But now as the program continues, it is our challenge (and duty) to rise at least some of the hurdles with every round of external validation.

Further information as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our proficiency test program "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)" can be downloaded in form of pdf-files at "www.udo-reischl.de", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style. **New in 2008:** due to the growing number of international participants, we will further include a brief discussion of the results in English (see the following pages).

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).

If you should have any further questions, please do not hesitate to contact me by e-mail: "udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de"

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, PD Dr. H.-J. Linde, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

APRIL 2008:

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 befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Probe # 81101), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 81003), *Helicobacter pylori* (Probe # 81304), EHEC (Probe # 81402), *Borrelia burgdorferi* (Probe # 81504), *Legionella pneumophila* (Probe # 81604), *Salmonella enterica* (Probe # 81704), *Listeria monocytogenes* (Probe # 81803), sowie *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila) pneumoniae* (Probe # 81412). 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. **Rückstellprobensätze können bei Bedarf über den Ringversuchsleiter formlos nachbestellt werden.**

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. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

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.

Der Direktnachweis von MRSA auf Ebene der Nukleinsäure gewinnt im Umfeld der medizinischen Mikrobiologie zunehmend an Attraktivität, und aktuell sind bereits von 4 namhaften Herstellern PCR-gestützte Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar. Deren Verwendung wurde im Zuge dieses Ringversuchs 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. *SCCmec*-basierte PCR Testkonzepte, die auf dem Nachweis der *SCCmec* Kasette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der *SCCmec* Kasette 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", Mikrobiologie, 2005, 175-181, sowie in Form einer Übersichtsarbeit aus unserem Hause in einer der kommenden Ausgaben der Zeitschrift *Laboratoriumsmedizin*.

Daß aber auch die *SCCmec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA Isolate mit selten vorkommenden *SCCmec* Subtypen oder MSSA Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen *SCCmec* Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der *SCCmec* Kasette vorhandene *mecA*-Gens versandt. Auch wenn wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzu prüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch neben einer Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken mit *mecA*-Gen und einem typischen CA-MRSA Patientenisolat aber auch wieder ein in unseren Breiten eher seltener vorkommender MRSA Stamm mit *SCCmec* Kasette vom Typ V.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt Probe # 81901 des aktuellen Ringversuchs 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 # 81903 enthielt diesmal eine relativ hohe Menge eines CA-MRSA Isolats (*S. aureus*, *mecA*-positiv, PVL-positiv, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml), die Probe # 81904 eine relativ hohe Menge eines MRSA Isolats (MRSA, PVL-negativ, **SCCmec Typ V**, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). Die letzte der 4 Proben enthielt keine Staphylokokken (# 81902; *E. coli*).

Dabei wurden von den insgesamt 153 Teilnehmern für die negative Probe # 81902 und die positive Probe # 81903 bis auf drei "fragliche", zwei falsch-positive sowie zwei falsch-negative Ergebnisse durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt (siehe Tabelle 2). Auch für die Probe # 81901 mit MSSA und *mecA*-positivem *S. epidermidis* wurde von der Mehrzahl der Teilnehmer ein richtig negatives Ergebnis berichtet. Interessanterweise wurden auch mit eigenentwickelten oder kommerziellen Testsystemen, die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruhen, diesmal relativ hohe Richtigkeitsquoten für Probe # 81901 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 13 als "fraglich" klassifizierten Ergebnissen für Probe # 81901 befinden sich daher auch 8 der insgesamt 9 Teilnehmer mit dem kommerziellen Hyplex StaphyloResist Testsystem sowie 5 Teilnehmer mit eigenentwickelten (*in house*) Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen. Die 12 Teilnehmer die diese Probe als "positiv" bewertet haben, sollten jedoch die Spezifität ihrer Testsysteme überprüfen oder sich gegebenenfalls deren technische Limitationen bewußt machen.

Insgesamt betrachtet spricht die Ergebnislage jedoch für eine hohe Zuverlässigkeit des NAT-gestützten Direktnachweises von MRSA aus klinischem Untersuchungsmaterial. Auch diesmal scheinen die SCCmec-basierten Testkonzepte wieder einen gewissen analytischen Vorteil gegenüber Testsystemen mit einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen zu besitzen. Wie aber in einigen der vorhergegangenen Ringversuche bereits mehrfach diskutiert, haben auch die erstgenannten Testkonzepte gewisse Limitationen. Dies wird im Rahmen des aktuellen Ringversuchs mit der Probe # 81904 erneut auf eindrucksvolle Weise aufgezeigt. Denn das hier versandte MRSA Isolat besitzt eine SCCmec Kasette vom Typ V, deren terminale Nukleinsäuresequenz sich deutlich von den typischerweise anzutreffenden MRSA Isolaten mit SCCmec Kassettyp I bis IV unterscheidet. Hier wurden lediglich von 99 der insgesamt 153 Teilnehmer richtig-positive Ergebnisse mitgeteilt.

Offensichtlich scheint auch das BD GeneOhm MRSA Testsystem diesen SCCmec Typ nicht diagnostisch zu erfassen, da alle Teilnehmer, die die Verwendung dieses kommerziellen Testsystems angegeben haben, Probe # 81904 durchwegs als MRSA negativ befundet haben. Dies ist auch der Grund für den relativ schlechten Prozentsatz an richtig positiven Befunden des BD GeneOhm MRSA Testsystems in Tabelle 3. Zugegebenermaßen ist dieser SCCmec Typ unter den MRSA Patientenisolaten noch relativ selten und die Ergebniskonstellation dieses Ringversuchs sollte den diagnostischen Wert dieses automatisierten kommerziellen Testsystems in der mikrobiologischen Praxis nicht schmälern. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die Probe # 81904 auch nicht als "falsch-negativ" bewertet.

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 SCCmec Typ V erfassen kann, stehen hiermit standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen dieser Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenesefaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen codierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 51 der insgesamt 153 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt - und erfreulicherweise waren auch diesmal alle Ergebnisse 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 of the current results (English version) for the growing number of international participants:

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 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. Sample # 81901 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 128 of the 153 participating laboratories. Most of the participants who reported "questionable" for sample # 81901 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 (# 81902) contained no target organisms but only *E. coli* cells. Sample # 81903 contained a relatively high number of CA-MRSA organisms (*S. aureus*, *mecA*-positive, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/ml) and sample # 81904 contained cells from an "atypical" MRSA strain (MRSA, PVL-negative, **SCCmec type V**, $\sim 5 \times 10^4$ CFU/ml). As expected, the latter organisms were not reliably detected by a number of *in-house* SCCmec-based assay concepts and they were also missed by one of the current commercial tests. Otherwise 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. Molecular detection of the *lukF/S-PV* gene was performed by 51 of the 153 participating laboratories - and all of the reporting laboratories correctly identified the PVL-positive MRSA strain in sample # 81903.

PCR-/NAT MRSA / cMRSA (RV 539) April 2008



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
81901	∅	62 / 72, 73,76	<i>S. aureus</i> + CoNS (<i>S. epidermidis</i> , <i>oxa^R</i>) (~ 5x10 ⁴ CFU/mL)
81902	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
81903	++	61 / 71, 72	cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxa^R</i> , PVL-pos) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
81904	++	61 / 72	MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxa^R</i> , SCCmec Type V) (~5x10 ⁵ CFU/mL)

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

n = 153	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	81901	81902	81903	81904	81901	81902	81903	81904	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	12	2	150 ¹⁾	99	n.d.	2	2	2	2
Negativ	128	149	2	50	nein <i>no</i>	151	151	150	151
Fraglich <i>Questionable</i>	13 ²⁾	2	1	4	ja <i>yes</i>	0	0	1	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>	%
GenoType MRSA Direct [21] (n=49)	96	96 / 97 [§]	99	95	95 / 96 [§]	99
In house PCR assay [28] (n=37)	59	59 / 72 [§]	82	65	65 / 71 [§]	92
BD GeneOhm MRSA [20] (n=37)	41	41 / 72 [§]	57	72	72 / 72 [§]	100
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=12)	22	22 / 23 [§]	96	23	23 / 24	96
Commercial assay kit [27] (n=11)	19	19 / 21 [§]	90	19	19 / 21 [§]	90
LightCycler Kits [23] (n=10)	16	16 / 20	80	16	16 / 19 [§]	84
Hyplex StaphyloResist [22] (n=9)	17	17 / 18	94	11	11 / 11 [§]	100
Andere / k.A. / other [29] (n=2)	4	4 / 4	100	3	3 / 4	75

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.
[§] 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 51 of the 153 participating laboratories. All results were correct.
²⁾ Depending on the concept (target genes) of the PCR assay used, "questionable" may be the correct result.



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2008

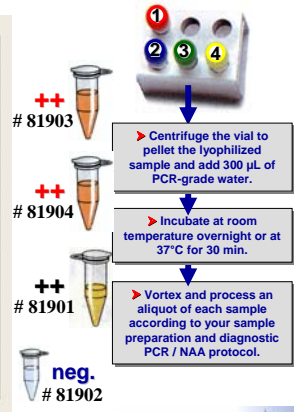
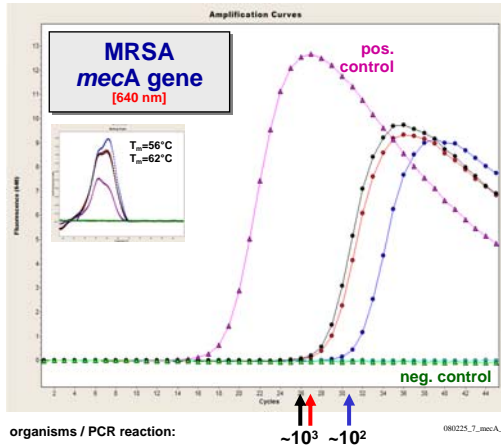
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

8	81901	30,04
9	81902	
10	81903	27,22
11	81904	26,84
12	pos. Ko. mecA	17,46
13	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 simultaneously species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



INSTAND-I03_I/08



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2008

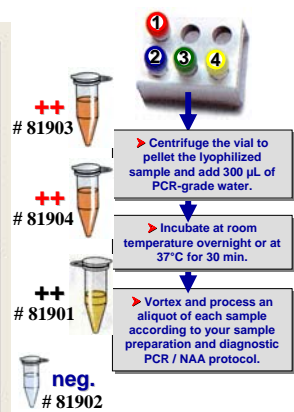
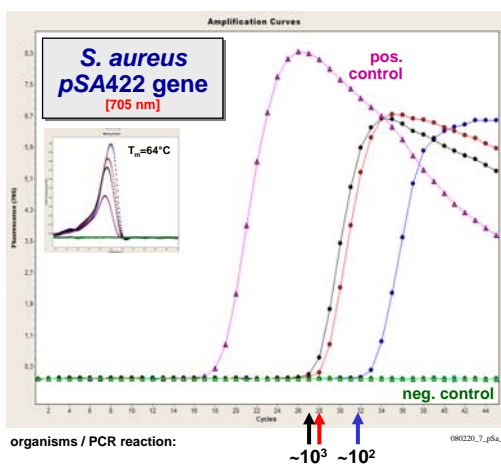
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

19	81901	31,73
20	81902	
21	81903	26,77
22	81904	26,04
23	pos. Ko. pSa	17,09
24	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 simultaneously species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



INSTAND-I04_I/08



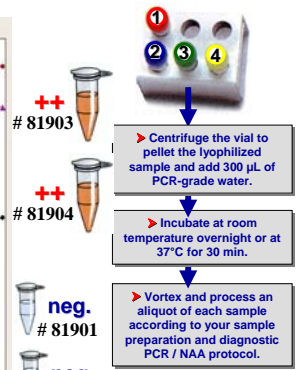
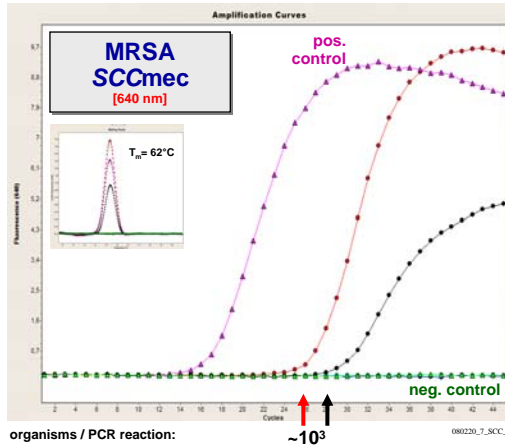
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2008
 Reischl / Lehn / Wolf

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

- 7 81901
- 8 81902
- 9 81903 26.08
- 10 81904 28.77
- 11 pos. Ko. SCC 16.24
- 12 NTC



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



INSTAND-I05_I/08



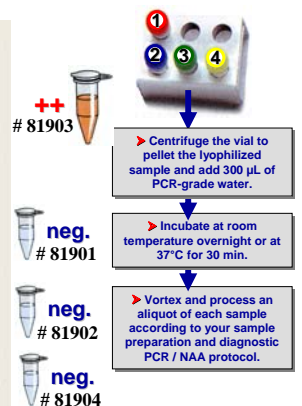
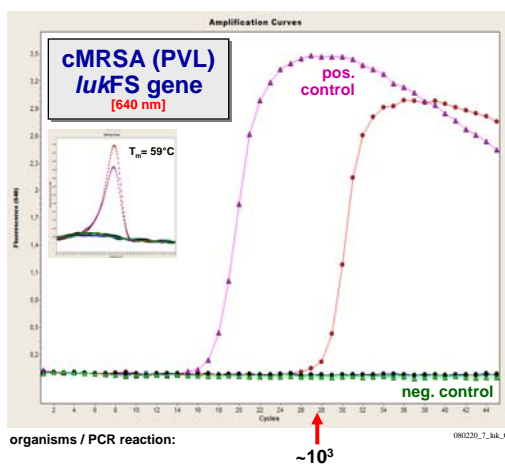
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2008
 Reischl / Lehn / Wolf

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

- 25 81901
- 26 81902
- 27 81903 26.51
- 28 81904
- 29 pos. Ko. luk 15.83
- 30 NTC



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



INSTAND-I06_I/08



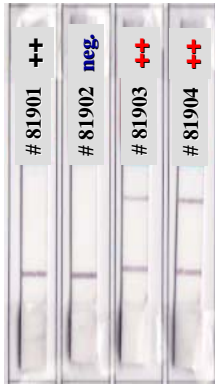
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2008

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

Reischl / Lehn / Wolf

**GenoQuick MRSA
 VER β 2.0**

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



← MRSA

← Conjugate control (CC)



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.



INSTAND-I07_I/08

Hain_MRSA