



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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion of the current results in English on pages 20-26 of this document. 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 mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Erfreulicherweise waren die Kommentare in den letzten sieben Jahren überwiegend positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

June 8, 2010

To the participants of the
INSTAND external quality assessment scheme (EQAS)
for NAATs in Diagnostic Bacteriology
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., Düsseldorf, Germany (attached to this letter).

This highly desired sheme for external quality assessment (EQAS) 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 (spring and autumn), 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 quality control and 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 since 2009:** 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 EQAS scheme 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,



PD 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. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs, PD Dr. W. Schneider, Dr. V. Fingerle

Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Neben der Aussendung von lyophilisierten Probenmaterialien zur systematischen Abprüfung von NAT-gestützten Testsystemen für derzeit 11 unterschiedliche bakterielle Zielorganismen bzw. Pathogenitätsfaktoren gab es im Rahmen dieser Ringversuchsrunde auch wieder zwei „highlights“: zum einen wurde in einer der 4 Einzelproben des RV 531 wieder die **schwedische Chlamydienvariante (nvCT)** ausgesandt und zum anderen befand sich der **sog. Züricher Drogenstamm** in einer der 4 Proben des MRSA Ringversuchs RV 539.

Eine weitere Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir beschäftigen uns gerade mit der Konfektionierung und Herstellung eines Proberingversuchs für den NAT-gestützten Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis*. Eine limitierte Anzahl von entsprechenden Probensets wird voraussichtlich im Rahmen der kommenden Ringversuchsrunde im November 2010 für interessierte Teilnehmer verfügbar sein. Als Sollwertlabor fungieren hier die Kollegen Dr. D. Frangoulidis und Dr. W. Splettstösser vom Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen.

Übrigens: das **REMMDI 2011** wird vom **14.-16. April 2011** wieder in Regensburg stattfinden. Diesen Termin eventuell schon mal vormerken... Nähere Informationen finden Sie demnächst unter www.remmdi.de

APRIL 2010:

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: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 1015303, 1015304, sowie die schwach positive Probe des RV 531 # 1015314), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 1015303), *Bordetella pertussis* (Probe # 1015324), *Helicobacter pylori* (Probe # 1015334), *Borrelia afzelii* (Probe # 1015352), *Legionella pneumophila* (Probe # 1015363), sowie *Listeria monocytogenes* (Probe # 1015381). Hervorzuheben ist auch die Verfügbarkeit von Probenmaterial mit nennenswerten Mengen der schwedischen *C. trachomatis* Mutante (nvCT) in Probe # 1015313 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 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 kommerzieller PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" 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 noch einmal ausdrücklich bei den geschätzten Kolleginnen und Kollegen für ihre 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 sehr häufig *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.

Daß aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte bereits im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden unter anderem 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 abzu prüfen, befand sich im aktuellen Ringversuch wieder einmal eine Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken, eine Probe mit einem typischen MRSA Patientenisolat, sowie eine Probe mit einem MRSA Isolat, das zugegebenermaßen sowohl aus phänotypischer wie aus genotypischer Sicht als ungewöhnlich bezeichnet werden kann. Bei diesem sogenannten „Züricher Drogenstamm“, der übrigens nicht aus „Hinterhältigkeit“ des Ringversuchsleiters sondern vielmehr auf ausdrücklichen Wunsch aus dem Teilnehmerkreis in das Panel aufgenommen wurde, handelt es sich nachweislich nicht um ein (im eigentlichen Sinne des Wortes) „exotisches“ Isolat, sondern wieder einmal um einen *S. aureus* Stamm, dem jeder Ringversuchsteilnehmer beim routinemäßigen MRSA Screening begegnen könnte. Im Jahre 2003 repräsentierte er beispielsweise 24 % aller in der Universitätsklinik Zürich isolierter MRSA

Stämme und auch aus epidemiologischer Sicht ist eine geographische Ausbreitung zu beobachten. Daß er im mikrobiologischen Routinelabor als solcher unter Umständen auch unerkannt bleiben bzw. als MSSA fehlklassifiziert werden könnte belegt die entsprechende frei zugängliche Veröffentlichung in BMC Microbiology: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/62>.

Ender, M., B. Berger-Bächi und N. McCallum (2007) Variability in SCCmecN1 spreading among injection drug users in Zurich, Switzerland. BMC Microbiology 2007, 7:62.

Neben seiner phänotypischen Klassifikation als „borderline“-resistenter (BORSA) oder „low-level“-resistenter MRSA mit Oxacillin MHK-Werten zwischen 0,5 und 4 µg/ml und einem PBP2a-unabhängigen Resistenzmechanismus ist inzwischen auch bekannt, daß aufgrund des untypischen genomischen Arrangements innerhalb der SCCmec-Kassette (SCCmec_{N1}) bei diesem MRSA Isolat vermutlich die meisten der etablierten SCCmec-basierten NAT-Testsysteme versagen.

Aber nun zurück zur Diskussion der interessanten Ringversuchsergebnisse. Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt Probe # 1015391 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge dieses ungewöhnlichen Methicillin-resistenten *S. aureus* Patientenisolats ("Züricher Drogenstamm", CHE 482; PVL-negativ; ~10⁵ CFU/mL). Probe # 1015394 enthielt eine etwa zehnfach geringere Menge eines typischen MRSA Isolats (MRSA, PVL-negativ, ~10⁴ CFU/mL). Die Probe # 1015393 enthielt diesmal ein Gemisch aus einem *S. aureus* Isolat (MSSA, PVL-negativ, ~10⁵ CFU/mL) und einer Methicillin-resistenten, Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (CoNS; *mecA*-positiv, ~5x10⁵ CFU/mL) und die letzte der 4 Proben enthielt keine Staphylokokken sondern lediglich nennenswerte Mengen an *E. coli* (# 1015392).

Für die positive Probe # 1015394 mit dem typischen MRSA Patientenisolat wurden von fast allen der insgesamt 188 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 (1 falsches Ergebnis bei den 4 Einzelproben wird ja bekanntermaßen toleriert), so sollten die beiden Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis diesen Ringversuch zum Anlaß nehmen, um die Auswahl ihres Testsystems zu hinterfragen und die Funktionalität ihrer Testkomponenten sicherzustellen. Im Gegensatz zu manch anderer Probe aus dieser Ringversuchsreihe handelt es sich bei diesem Stamm definitiv nicht um ein MRSA-Isolat mit exotischer Genkonstellation, seltenen bzw. atypischen SCCmec Kassettentypen oder Sequenzvarianten innerhalb der populären Markergene für PCR-gestützte Nachweisverfahren. Die MRSA-negative Probe # 1015392 wurde erfreulicherweise ebenfalls 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 abzu prüfen.

Wie in einigen der vorhergegangenen Ringversuche bei vergleichbarer Probenkonstellation beobachtet, so wurde auch für die Probe # 1015393 mit einer Mischung aus einem PVL-negativen MSSA und einem *mecA*-positiven *S. epidermidis* 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 13 als "fraglich" klassifizierten Ergebnissen für Probe # 1015393 befinden sich daher auch 3 der insgesamt 5 Teilnehmer mit dem kommerziellen Hyplex (jetzt unter der neuen Bezeichnung: Amplex) StaphyloResist Testsystem sowie 10 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 # 1015391, die diesmal eine nennenswerte Menge des sogenannten „Züricher Drogenstamms“ 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 der in der zuvor aufgeführten Veröffentlichung beschriebenen Prävalenz dieses sowohl phänotypisch wie auch genotypisch ungewöhnlichen low-level Methicillin-resistenten MRSA Isolats möchte ich es jedoch den Teilnehmern dieses Ringversuchs überlassen zu bewerten, ob dieser initial von Züricher i.v. Drogenabhängigen isolierte MRSA Stamm wirklich zu den Exoten gezählt werden sollte. Es bleibt wohl unbestritten, daß ein fehlender Nachweis schwerwiegende Konsequenzen für betroffene Patienten, aber auch für mögliche Kontaktpatienten nach sich ziehen kann. Wenn man sich die entsprechenden Richtigkeitsquoten für Probe # 1015391 differenziert betrachtet, dann wird schnell deutlich, daß die derzeit etablierten *SCCmec*-basierten Testsysteme diesen MRSA Stamm offensichtlich nicht erfassen. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die besagte Probe # 1015391 fairerweise nicht als "falsch-negativ" bewertet.

Abgesehen von der zuletzt diskutierten Probe spricht die Ergebnislage dieses Ringversuchs erneut 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 unserer Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 56 der insgesamt 188 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und bei allen 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.

ENGLISCH:

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 MRSA isolate, a mixture of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci and *S. aureus*, as well as an "atypical but not exotic" extremely low-level methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strain belonging to ST45, which circulated among intravenous drug users in the Zurich area.

Sample # 1015394 of the current set of QC samples contained a relatively high amount of typical MRSA organisms (*S. aureus*, *mecA*-positive, PVL-negative, $\sim 10^4$ CFU/ml). With the exception of 2 participants, this sample was tested positive by the MRSA-specific NAT assays at all participating laboratories. The two participants who have reported a negative MRSA result for sample # 1015394 should take immediate efforts to check and improve the analytical sensitivity and/or specificity of their NAT assay concepts.

Sample # 1015393 of the current set contained a mixture of a methicillin-susceptible *S. aureus* isolate (MSSA, PVL-negative, $\sim 10^5$ CFU/ml) and a CoNS strain (*mecA*-positive, $\sim 5 \times 10^5$ CFU/ml). Correct (negative) results were reported by 154 of the 188 participating laboratories. Most of the participants who reported "questionable" for sample # 101593 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 (# 1015392) contained no target organisms but only *E. coli* cells. For this sample, negative results were reported by 184 of the 188 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.

As mentioned before, sample # 1015391 contained a significant number of cells of an "atypical" MRSA strain (PVL-positive, MLST type 45, $\sim 1 \times 10^6$ CFU/ml), isolated from intravenous drug users in the Zurich area and harboring an uncommon SCCmec_{N1} cassette. Further molecular and phenotypical details of this particular strain can be found in the following open access paper: Ender, M., B. Berger-Bächli und N. McCallum (2007) Variability in SCCmec_{N1} spreading among injection drug users in Zurich, Switzerland. BMC Microbiology 2007, 7:62. Link: <http://www.biomedcentral.com/1471-2180/7/62>. Briefly, the strain presented as a MSSA by phenotypic oxacillin resistance tests, although it carries a staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) element encoding a functional *mecA* gene and it produces PBP2a. All the drug clone isolates have low oxacillin resistance levels, with MICs between 0.5 and 4 µg ml⁻¹, which can make them difficult to detect by phenotypic tests. Except for the detection of the *mecA* gene, genotypic tests, which rely on identifying known features of SCC*mec*s or SCC*mec*-chromosomal junctions, have also failed to identify this clone. Misdiagnosis of such strains with very low, phenotypically susceptible, minimum inhibitory concentrations (MICs) is a major problem necessitating the use of molecular detection methods which are adapted to cover also some variant target genes or target regions.

Presumably due to uncommon sequence motifs within the SCCmec_{N1} cassette, the organism in sample # 1015391 of the current set of QC samples was missed by a number of *in-house* PCR assays and by all of the commercial SCC*mec*-based assay concepts applied by the participants. The results are summarized in tables 3 and 4. Since this weird MRSA strain is certainly not listed

among the most 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, backup samples of the corresponding ring trial set are available from the ring trial coordinator Dr. U. Reischl upon request.

Except the issue with the MRSA strain in sample # 1015391, 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 # 1015392 to # 1015394.

Molecular detection of the *lukF/S-PV* gene was performed by 56 of the 188 participating laboratories and all laboratories correctly classified the MRSA strains in samples #1015391 and ##1015394 as PVL negatives.

**PCR-/NAT MRSA / cMRSA
 (RV 539) April 2010**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
1015391	(++)	61 / 72	MRSA ("Züricher Drogenstamm"; CHE 482) SCCmec PCR's vermutlich falsch negativ ! (S. aureus, oxa ^R , PVL-neg) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1015392	∅	62	Escherichia coli K12
1015393	∅	62 / 72, 76	MSSA + CoNS (S. aureus, CoNS, oxa ^R) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)
1015394	+	61 / 72	MRSA (S. aureus, oxa ^R , PVL-neg) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)

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

n = 188	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	1015391	1015392	1015393	1015394	1015391	1015392	1015393	1015394	
Befund Result									
Positiv	48	4	21	186	n.d.	2	2	2	2
Negativ	135	184	154	2	nein no	185	186	185	186
Fraglich Questionable	5	0	13	0	ja yes	1	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 True positive results			NAT richtig negativ True negative results		
	Absolut Absolute	Relativ Relative	%	Absolut Absolute	Relativ Relative	%
BD GeneOhm MRSA [20] (n=42)	46	46 / 83 §	55	79	79 / 82 §	96
GenoType MRSA Direct [21] (n=41)	50	50 / 80 §	62	79	79 / 81 §	98
Hyplex StaphyloResist [22] (n=5)	10	10 / 10	100	6	6 / 7 §	86
LightCycler Kits [23] (n=7)	14	14 / 14	100	8	8 / 10 §	80
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=36)	37	37 / 72	51	71	71 / 72	99
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=17)	19	19 / 34	56	34	34 / 34	100
Commercial assay kit [27] (n=10)	19	19 / 20	95	11	11 / 19 §	58
In house PCR assay [28] (n=38)	55	55 / 74 §	74	64	64 / 74 §	86
Andere / k.A. / other [29] (n=6)	8	8 / 11 §	73	9	9 / 10 §	90

* 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.

Tabelle 4: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden. (Anmerkung: in dieser Tabelle sind nur die Ergebnisse für Probe 1015392, 1015393, und 1015394 dargestellt) .

Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods (Note: only the results with samples # 1015392, # 1015393, # 1015394 are depicted in this table).

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=42)	42	42 / 42	100	79	79 / 82 §	96
GenoType MRSA Direct [21] (n=41)	41	41 / 41	100	79	79 / 81 §	98
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=5)	5	5 / 5	100	6	6 / 7 §	86
LightCycler Kits [23] (n=7)	7	7 / 7	100	8	8 / 10 §	80
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=36)	36	36 / 36	100	71	71 / 72	99
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=17)	17	17 / 17	100	34	34 / 34	100
Commercial assay kit [27] (n=10)	10	10 / 10	100	11	11 / 19 §	58
<i>In house</i> PCR assay [28] (n=38)	36	36 / 38	95	64	64 / 74 §	86
Andere / k.A. / other [29] (n=6)	6	6 / 6	100	9	9 / 10 §	90

* 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



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2010

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

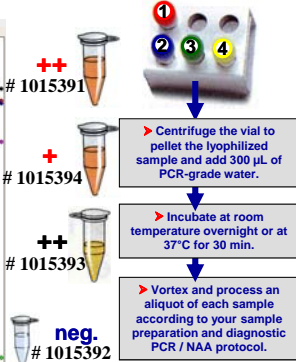
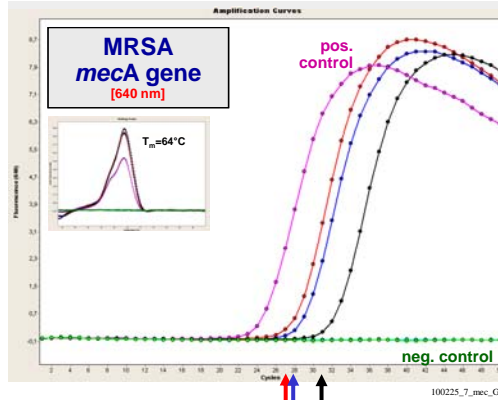
Reischl / Linde / Wolf

13	1015391	27,06
14	1015392	
15	1015393	27,05
16	1015394	31,09
17	Pos. Ko. mecA	23,48
18	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/10



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2010

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

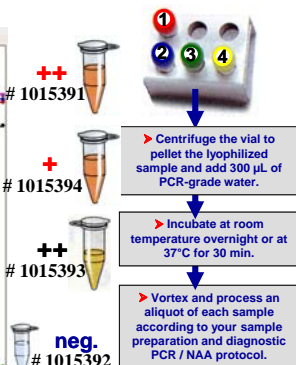
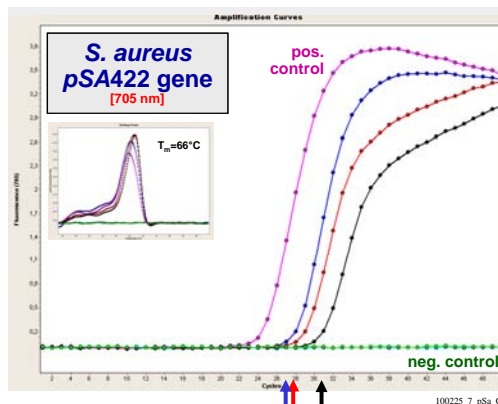
Reischl / Linde / Wolf

7	1015391	26,76
8	1015392	
9	1015393	27,62
10	1015394	29,35
11	Pos. Ko. pSa	23,36
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 simultaneously species confirmation. Rapid Cycle Real-Time PCR: methods and applications. Springer Verlag, 93-105.



INSTAND-I04_I/10



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2010

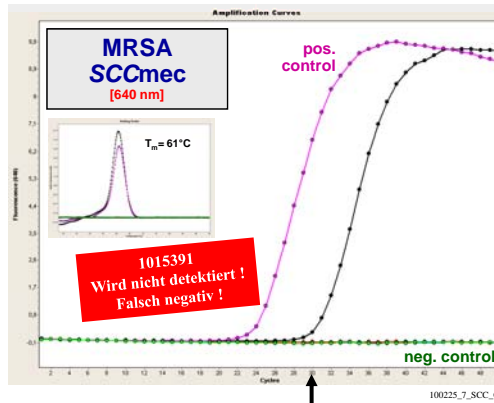
➤ **Evaluation** (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

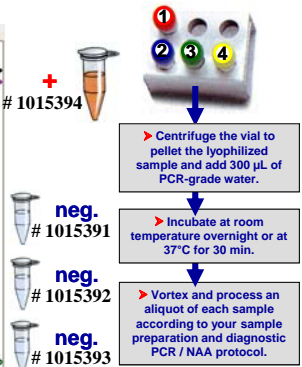
- 1 1015391
- 2 1015392
- 3 1015393
- 4 1015394
- 5 Pos. Ko. SCC 29,90
- 6 NTC 23,19



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



organisms / PCR reaction: ~10²



IN STAND-I05_I/10



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 04.2010

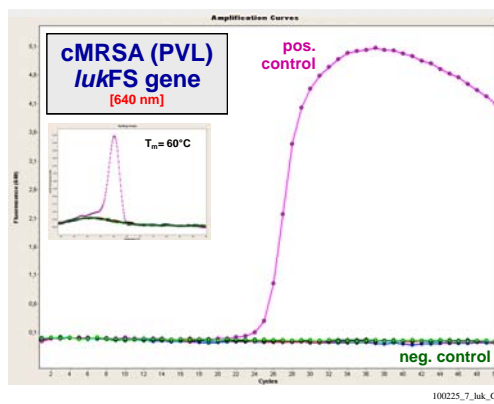
➤ **Evaluation** (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

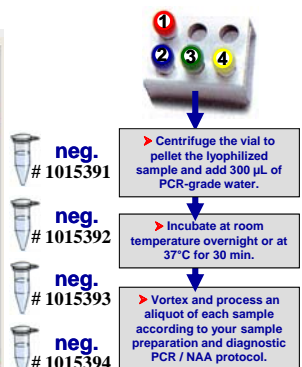
- 19 1015391
- 20 1015392
- 21 1015393
- 22 1015394
- 23 Pos. Ko. luk 23,23
- 24 NTC



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



organisms / PCR reaction:



IN STAND-I06_I/10



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2010

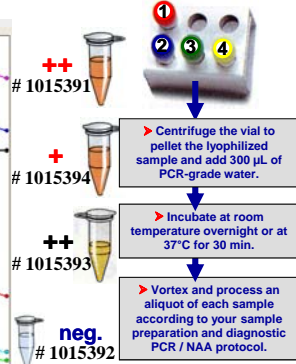
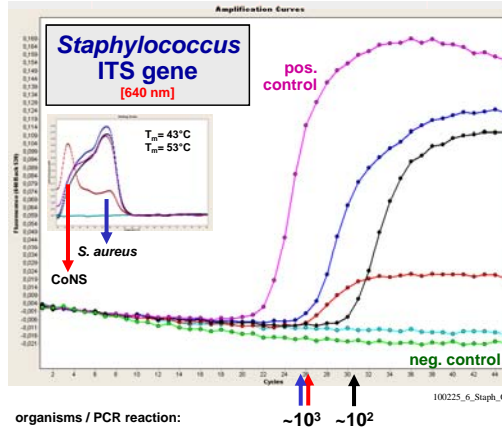
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

1	1015391	24.91
2	1015392	24.20
3	1015393	24.20
4	1015394	28.82
5	Pos. Ko. Staph ITS	20.70
6	NTC	



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



INSTAND-I07_I/10



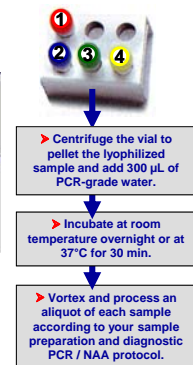
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2010

Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Linde / Wolf

Xpert™ MRSA



INSTAND-I08_I/10

91901_GeneExpert.jpg



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

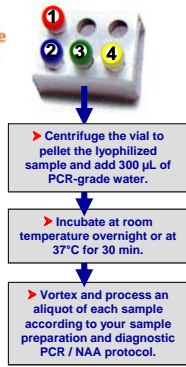
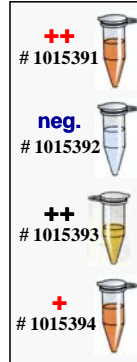
status 04.2010

➤ Evaluation (commercial PCR assay):

BD GeneOhm MRSA Test



Reischl / Linde / Wolf



INSTAND-I09_I/10

MRSA BD



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 04.2010

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

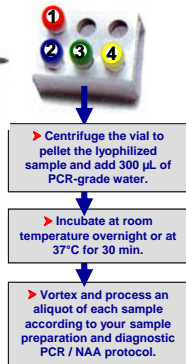
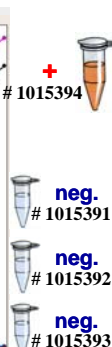
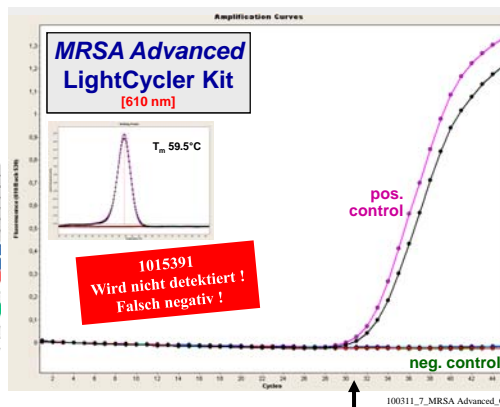
Reischl / Linde / Wolf

1	HFCH	31,21
2	#NCH	
3	1015391	
4	1015392	
5	1015393	
6	1015394	31,85

LightCycler® MRSA Advanced

Roche

Run	Sample	Result	Comment
1	1015391	Not Detected	
2	1015392	Not Detected	
3	1015393	Detected	
4	1015394	Detected	



INSTAND-I10_I/10

organisms / PCR reaction: ~10²