



Regensburg, den 21. Dezember 2008

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

Dear Participant, dear Colleague,

Please find a cover letter and a brief discussion (NEW !) of the current results after the corresponding sections in German language. As usual, tables with the results are presented in a bilingual style.

Sehr geehrte Kolleginnen und Kollegen,

Sie erhalten hiermit die Auswertung des aktuellen INSTAND-Ringversuchs zum Bakteriengenom-Nachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken.

Ihre individuellen Resultate und deren Bewertung können Sie in gewohnter Weise der beigefügten Teilnahmebescheinigung entnehmen.

Falls Sie an einer etwas umfangreicheren Diskussion unserer Ringversuchsaktivitäten im Bereich "Bakteriengenom-Nachweis" und näheren Informationen zur Konzeption der Ringversuchsproben interessiert sein sollten, sei hier wie gehabt auf folgende Veröffentlichungen in den Zeitschriften "Der Mikrobiologe" (Herausgeber: BÄMI, Berufsverband der Ärzte für Mikrobiologie und Infektionsepidemiologie e.V.) und "Hygiene und Mikrobiologie" (Herausgeber: DGHM, Deutsche Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie e.V.) verwiesen:

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2003) "Bakteriengenom-Nachweis PCR / NAT": Eine neue Ringversuchsreihe von INSTAND e.V. zur externen Qualitätskontrolle molekularbiologischer Nachweisverfahren in der bakteriologischen Diagnostik. *Mikrobiologe* **13**:149-156.

> Reischl, U., N. Lehn, H. Wolf und E. Straube (2004) *Hyg. Mikrobiol.* **8**:19-21.

Sowohl im Zusammenhang mit einer Erweiterung unseres Ringversuchsprogramms als auch bei der Gestaltung zukünftiger erregerspezifischer Ringversuche sind wir für alle kritischen Kommentare und Anregungen überaus dankbar. Projekte wie diese wachsen erst mit dem konstruktiven *feedback* der einzelnen Teilnehmer. Bis auf wenige Ausnahmen waren die bisherigen Kommentare jedoch durchwegs positiv - vielen Dank !!

Mit freundlichen und kollegialen Grüßen,

PD Dr. Udo Reischl

Ringversuchsleiter Bakteriengenomnachweis
Mitglied der Qualitätssicherungskommission der DGHM

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

December 22, 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,



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. 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

NOVEMBER 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 Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befanden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 82002), EHEC (Proben # 82401, # 82402), MRSA (Probe # 82902), *Chlamydia* (bzw. *Chlamydophila pneumoniae* (Probe # 82412), sowie *Mycoplasma pneumoniae* (Probe # 82424). 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.

In bewährter Form werden im Folgenden die Ergebnisse der jeweiligen erregerspezifischen Ringversuche dargestellt. Tabelle 1 zeigt dabei die Probenzusammensetzung und das erwartete Ergebnis (Sollwert) mit den entsprechenden Codenummern der Ergebnisbögen. Die von den einzelnen Teilnehmern mitgeteilten Ergebnisse werden in Tabelle 2 nach der Häufigkeit der Mitteilung von positiven oder negativen Ergebnissen und in Tabelle 3 nach der absoluten Anzahl der richtig positiven und richtig negativen Ergebnisse sowie deren prozentualen Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum "Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden. Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "www.udo-reischl.de"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. (www.instandev.de) als *pdf*-Files zum freien Download bereit. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei dem geschätzten Kollegen Herrn Dr. Christoph Schoerner, Erlangen, für seine zahlreichen und überaus konstruktiven Kommentare und Anregungen zu den Ausführungen in dieser Ringversuchsdiskussion bedanken.

RV 539: MRSA

Zuerst einmal, wie gehabt, eine wichtige Anmerkung vorab: dieser Ringversuch ist ausschließlich für den **Direktnachweis von MRSA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise Nasenabstrichen) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen an entsprechenden Zielorganismen. Für interessierte Teilnehmer soll an dieser Stelle noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, daß sich mit Testsystemen, die üblicherweise für die Kulturbestätigung von *S. aureus* und/oder MRSA ausgelegt sind, diese geringen Mengen nicht immer zuverlässig nachweisen lassen werden. Eine Teilnahme an diesem Ringversuch ist daher nur für solche diagnostische Laboratorien erfolversprechend 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. SCC*mec*-basierte PCR Testkonzepte, die auf dem Nachweis der SCC*mec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec* Kassette im *S. aureus* Genom als Zielsequenz verwenden. Eine Diskussion dieser Problematik findet sich beispielsweise in: Kola et al., "Workshop zum MRSA-Screening am 25.05.05 in Hannover", Mikrobiologe, 2005, 175-181, sowie in Form einer Übersichtsarbeit aus unserem Hause in der Zeitschrift *Laboratoriumsmedizin*. (J. Lab. Med., 2008, 32:253-265).

Daß aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen einiger früherer Ringversuche eindrucksvoll aufgezeigt werden: hier wurden bereits einige MRSA-Isolate mit selten vorkommenden SCC*mec*-Subtypen oder MSSA-Isolate mit einer an den jeweiligen Enden typischen SCC*mec*-Sequenz, aber mit einer natürlichen Deletion des üblicherweise innerhalb der SCC*mec*-Kassette vorhandene *mecA*-Gens versandt. Da wir uns im Rahmen dieser Ringversuchsserie zum Ziel gesetzt haben primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzutesten, befand sich im aktuellen Ringversuch lediglich eine Art Verdünnungsreihe eines typischen *community acquired* (CA)-MRSA Patientenisolats, aber keine Mischungen aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken oder Isolate von in unseren Breiten eher seltener vorkommender MRSA-Stämmen mit exotischen SCC*mec* Kassettentypen.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt Probe # 82904 des aktuellen Ringversuchs eine relativ hohe Menge eines Methicillin-resistenten *S. aureus* Patientenisolats (MRSA, PVL-positiv, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL, spa-Typ 310, SCC*mec*-Typ IVa). Die Probe # 82901 enthielt das gleiche *S. aureus* Isolat in einer etwa zehnfach geringeren Menge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) und die Probe # 82902 eine

etwa hundertfach geringere Menge ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) dieses PVL-positiven MRSA Isolats. Eine der 4 Proben enthielt keine Staphylokokken sondern lediglich eine nennenswerte Menge von *E. coli* (# 82903).

Für die am stärksten positive Proben # 82904 wurden von den insgesamt 151 Teilnehmern bis auf ein "fragliches" und drei falsch-negativ Ergebnisse durchwegs korrekte Resultate mitgeteilt (siehe Tabelle 2). Selbst für die etwas schwächer positive Probe # 82901 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL MRSA) wurde von der Mehrzahl der Teilnehmer ein richtig positives Ergebnis berichtet. Lediglich bei der relativ schwach positiven Probe # 82902 ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL MRSA) scheint die untere Nachweisgrenze einiger Testsysteme erreicht bzw. bereits leicht unterschritten zu sein. Hier konnten nur noch 95 der insgesamt 151 Teilnehmer mit ihren PCR-gestützten Testsystemen ein korrekt positives Ergebnis für MRSA beobachten. Ungeachtet des verwendeten Testsystems wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für die schwach positive Probe # 82902 fairerweise nicht als "falsch-negativ" bewertet. Im Fall eines negativen Ergebnisses für die hoch positive Probe # 82904 und die etwas schwächer positive Probe # 82901 ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL MRSA) oder einer Mitteilung von 4 negativen bzw. fraglichen Ergebnissen konnte den entsprechenden Teilnehmern jedoch kein Zertifikat für den aktuellen Ringversuch erteilt werden.

Da die Probensets diesmal keine Gemische aus Koagulase-negativen Staphylokokken und *S. aureus* Isolaten enthielten, wurden erwartungsgemäß auch mit eigenentwickelten oder kommerziellen Testsystemen, die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA*-Gen beruhen, relativ hohe Richtigkeitsquoten für die 3 positiven Proben erzielt. Die 4 als "fraglich" klassifizierten Ergebnisse für Probe # 82901 wurden dabei von einem 1 der insgesamt 38 Teilnehmer mit dem kommerziellen GenoType MRSA Direct Testsystem, einem der insgesamt 9 Teilnehmer mit dem kommerziellen GenoQuick MRSA Testsystem, sowie zwei Teilnehmern mit eigenentwickelten (*in house*) Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA*-Gen bzw. der SCC*mec*-Kassette berichtet. Die insgesamt 11 Teilnehmer, die diese Probe als "negativ" bewertet haben, sollten die Sensitivität der Lyse- und Amplifikationskomponenten ihrer jeweiligen 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. Im Durchschnitt scheint die untere Nachweisgrenze aber mit 10^3 Erregeräquivalenten pro mL Probenmaterial erreicht zu sein - dies entspricht umgerechnet in etwa 10^2 CFU in dem für PCR-Untersuchungen typischerweise prozessiertem Probenvolumen von 100 µl. Betrachtet man die nach Testsystemen aufgeschlüsselten Richtigkeitsquoten in Tabelle 3, so scheinen auch diesmal die SCC*mec*-basierten Testkonzepte wieder 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 von neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen mit der Probe # 82902 wieder standardisierte Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen dieser Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenitätsfaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen kodierende Gene *lukF/S-PV* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 56 der insgesamt 151 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt: leider konnten hier nur 32 Teilnehmer durchgehend korrekte Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung berichten. Bei Probe # 82902 konnten 15 Laboratorien das *lukF/S-PV* Gen nicht korrekt nachweisen und bei 9 Teilnehmern versagten die PVL-spezifischen Testsysteme sogar bei zwei der insgesamt drei CA-MRSA positiven Proben. 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.

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 lower limit of detection, the current set was designed as a kind of dilution series of the corresponding target organisms. This time we used a typical CA-MRSA isolate and no *S. aureus* strains of "exotic" SCCmec types or complex mixtures with coagulase-negative staphylococci were included. Sample # 82904 of the current set contained a methicillin-resistant *S. aureus* patient isolate (MRSA, PVL-positive, $\sim 1 \times 10^5$ CFU/mL, spa-type 310, SCCmec type IVa). Sample # 82901 contained the same isolate in an approximately ten times lower amount ($\sim 1 \times 10^4$ CFU/mL) and sample # 82902 in an approximately hundred times lower amount ($\sim 1 \times 10^3$ CFU/mL). One sample of the current set (# 82903) contained no target organisms but only *E. coli* cells.

The majority of participants reported correct positive results for the strong positive sample # 82904 and the weaker positive sample # 82901. Even for the weak-positive sample # 82902, 95 of the participating laboratories were able to detect the MRSA target organisms with their corresponding PCR-assays. It seems that we have touched the lower limit of detection for several commercial and *in-house* PCR assays with the latter sample containing approximately 10^3 target organisms per mL. At least theoretically, this corresponds to a cell number of 100 MRSA organisms in a sample volume of 100 μ l, which is typically processed in the diagnostic PCR workup. Since the number of target organisms was relatively low, ring trial certificates were issued even when a negative MRSA result was reported for sample # 82902.

**PCR-/NAT MRSA / cMRSA
 (RV 539) November 2008**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
82901	++	61 /71, 72	cMRSA (<i>S. aureus</i> , oxa ^R , PVL-pos) (~ 1x10 ⁴ CFU/mL)
82902	+	61 /71, 72	cMRSA (<i>S. aureus</i> , oxa ^R , PVL-pos) (~ 1x10 ³ CFU/mL)
82903	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
82904	+++	61 /71, 72	cMRSA (<i>S. aureus</i> , oxa ^R , PVL-pos) (~ 1x10 ⁵ CFU/mL)

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

n = 151	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	82901	82902	82903	82904	82901	82902	82903	82904	
Befund <i>Result</i>									
Positiv	136 ¹⁾	95 ¹⁾	1	147 ¹⁾	n.d.	0	0	0	0
Negativ	11	50 ²⁾	149	3	nein no	151	151	151	151
Fraglich <i>Questionable</i>	4	6	1	1	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>	%
GenoType MRSA Direct [21] (n=38)	88	88 / 112 §	79	38	38 / 38	100
In house PCR assay [28] (n=41)	101	101 / 119 §	85	39	39 / 40 §	98
BD GeneOhm MRSA [20] (n=39)	112	112 / 116 §	97	39	39 / 39	100
LightCycler Kits [24] (n=15)	43	43 / 45	96	14	14 / 14 §	100
GeneXpert (Cepheid) [25] (n=5)	13	13 / 15	87	5	5 / 5	100
Commercial assay kit [27] (n=8)	19	19 / 24	79	8	8 / 8	100
Hyplex StaphyloResist [23] (n=4)	11	11 / 12	92	4	4 / 4	100
GenoQuick MRSA [22] (n=9)	15	15 / 23 §	65	9	9 / 9	100
Andere / k.A. / other [29] (n=3)	6	6 / 9	67	3	3 / 3	100

* Durch Mehrfachnennung oder fehlende Angabe kann die absolute Zahl der Ergebnisse (Tab. 2) von der Anzahl der Teilnehmer abweichen.
 Due to reporting results of multiple assay systems or missing specifications, the effective numbers are not correlating with the number of participants.

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

Comments: ¹⁾ cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 56 laboratories. Only 32 of them reported correct results for all three CA MRSA-positive samples.



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

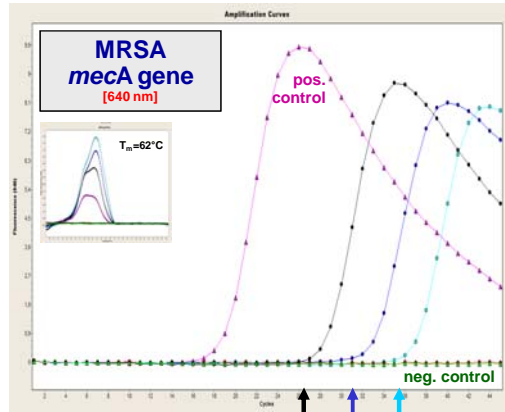
Reischl / Linde / Wolf

- 1 82901 31,66
- 2 82902 35,47
- 3 82903 27,03
- 4 82904 17,58
- 5 Pos. Contr. mecA 17,58
- 6 NTC

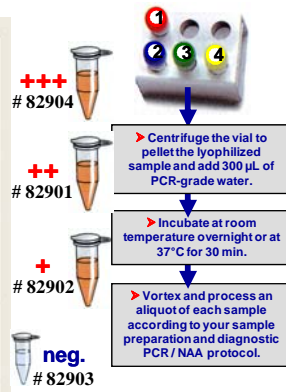


LightCycler PCR protocol:

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



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$ $\sim 10^2$ $\sim 10^1$



INSTAND-I03_II/08



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2008

Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

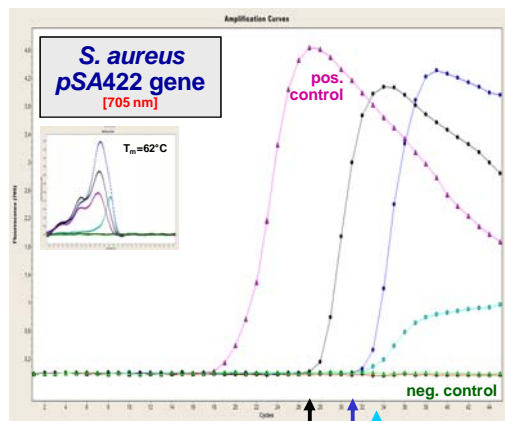
Reischl / Linde / Wolf

- 13 82901 30,96
- 14 82902 31,14
- 15 82903 26,26
- 16 82904 19,06
- 17 Pos. Contr. psSa442 19,06
- 18 NTC

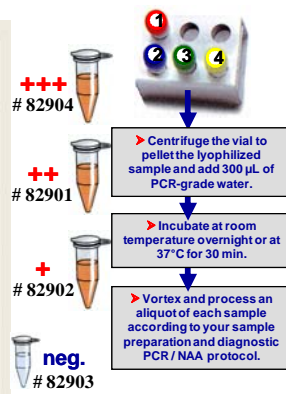


LightCycler PCR protocol:

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.



organisms / PCR reaction: $\sim 10^3$ $\sim 10^2$ $\sim 10^1$



INSTAND-I04_II/08



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2008

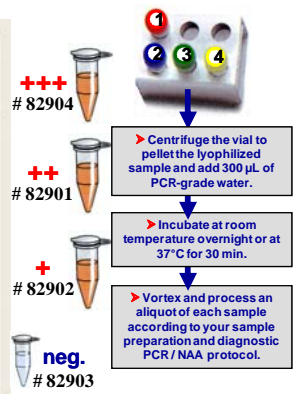
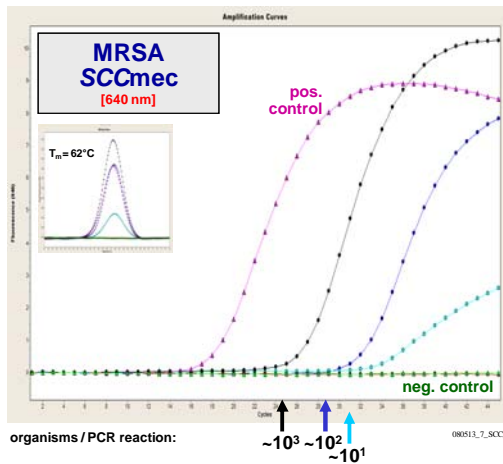
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

19	82901	31,20
20	82902	32,63
21	82903	
22	82904	25,83
23	Pos. Contr. scc	17,37
24	NTC	



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



INSTAND-I05_II/08



539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2008

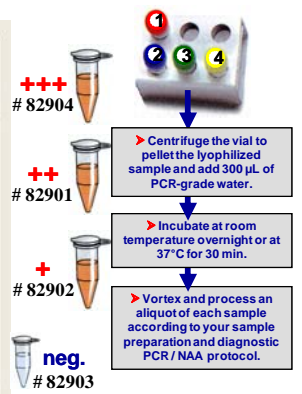
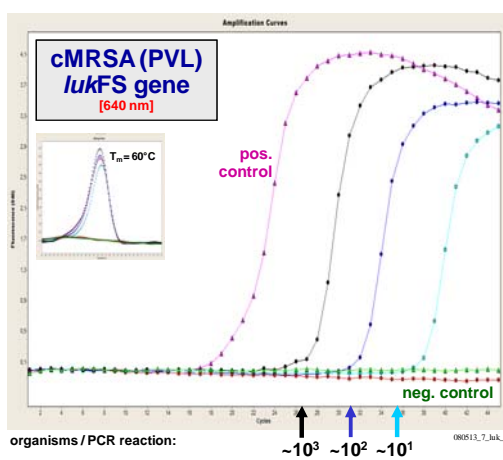
Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

7	82901	30,30
8	82902	36,04
9	82903	
10	82904	25,86
11	Pos. Contr. luk	19,55
12	NTC	



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



INSTAND-I06_II/08



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 11.2008

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

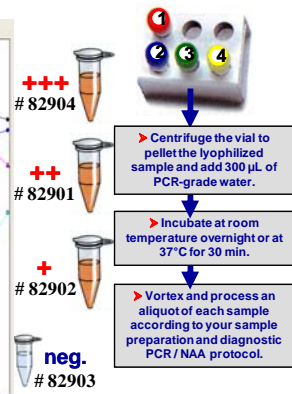
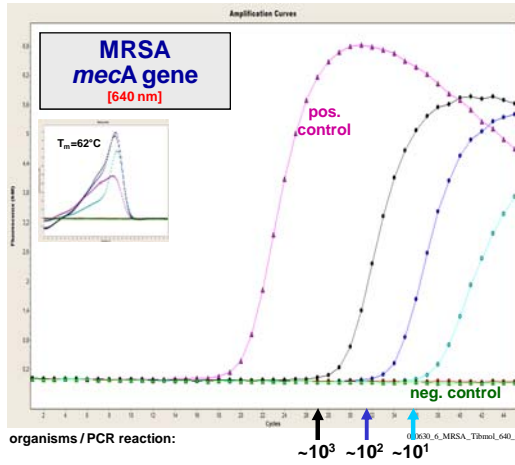
1	82901	32.70
2	82902	36.39
3	82903	
4	82904	28.08
5	Pos. Contr.	18.98
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Proprietary MRSA LightCycler assay developed by TIB Molbiol, Berlin, Germany
<http://www.tib-molbiol.de>



INSTAND-I07_II/08



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 11.2008

➤ Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Linde / Wolf

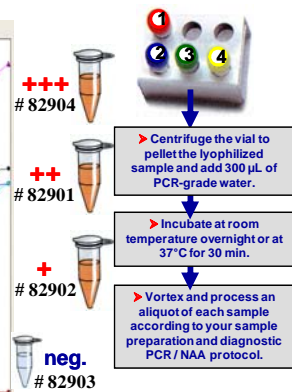
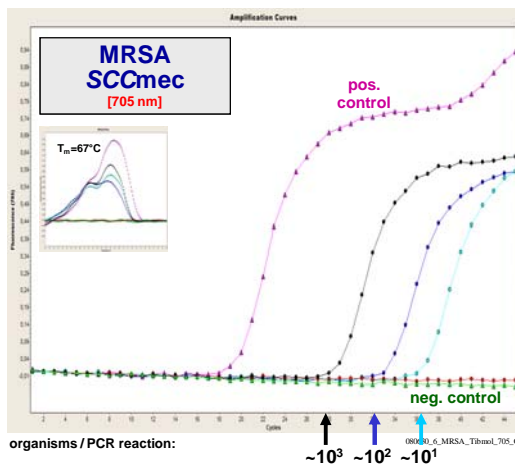
1	82901	31.88
2	82902	35.11
3	82903	
4	82904	27.28
5	Pos. Contr.	18.15
6	NTC	



LightCycler PCR protocol:
 Proprietary MRSA LightCycler assay developed by TIB Molbiol, Berlin, Germany
<http://www.tib-molbiol.de>



INSTAND-I08_II/08





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>



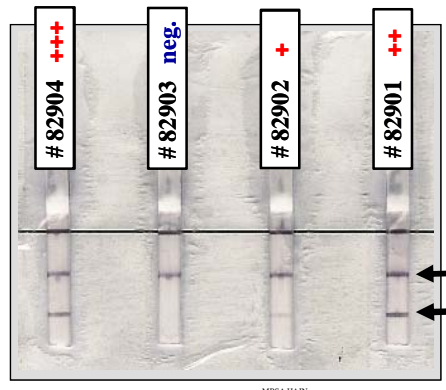
539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2008

➤ Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Linde / Wolf

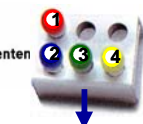
**GenoQuick MRSA
 Vers. 2.0**

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



Conjugate control (CC)

MRSA



- 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-I09_II/08



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>

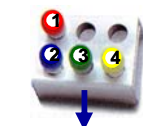
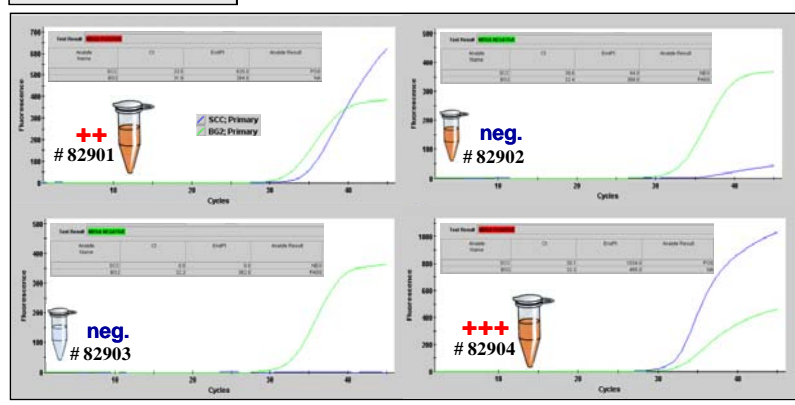


539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2008

➤ Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Linde / Wolf

Xpert™ MRSA



- 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-I10_II/08