



Regensburg, den 11. Dezember 2009

**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 in English on the following pages 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 beigelegten 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. *Mikrobiologie* **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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs**

**December 11, 2009**

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. (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](http://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](http://www.udo-reischl.de)", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style. **New in 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](mailto: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, Dr. V. Fingerle, Prof. Dr. E. Straube, Prof. Dr. M. Maaß, Prof. Dr. E. Jacobs**

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

Eine kurze Anmerkung vorab: Aufgrund zahlreicher Anfragen aus dem Teilnehmerkreis ist für den Herbst 2010 eine Erweiterung des Spektrums an Zielorganismen geplant. Wir werden im Laufe des Jahres je einen sog. **Proberingversuch** für den Nachweis von *Coxiella burnetti* und *Francisella tularensis* anbieten. Als Sollwertlabor wird hier das Institut für Mikrobiologie der Bundeswehr in München (Konsiliarlabor für Tularämie) in enger Absprache mit dem Konsiliarlabor für Q-Fieber in Stuttgart fungieren. Bei erfolgreichem Verlauf werden diese erregerspezifischen Ringversuche dann in das reguläre Ringversuchsprogramm "Bakteriengenomnachweis PCR/NAT" von INSTAND e.V. aufgenommen. Sollten Sie Interesse an der Teilnahme an diesem "Proberingversuch" mit limitierter Anzahl von entsprechenden Probensets haben, so bitten wir Sie um kurze Mitteilung an den Ringversuchsleiter (udo.reischl@klinik.uni-regensburg.de).

### NOVEMBER 2009:

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 # 92001, 92004, sowie die drei schwach positiven Proben des RV 531), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 92003), *Borrelia burgdorferi* (Proben # 92504), *Salmonella enterica* (Probe # 92701), sowie cMRSA (Probe # 92903). 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](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "Auswertung der Ringversuche" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. ([www.instandev.de](http://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 zumeist *mecA*-positiv sind) vorliegt. Einen attraktiven Ansatzpunkt zur Lösung dieses Problems bieten sog. *SCCmec*-basierte PCR Testkonzepte, die auf dem Nachweis der *SCCmec*-Kassette innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der *SCCmec* 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 *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*-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, zwei Proben mit jeweils unterschiedlichen Mengen eines typischen *community acquired* (CA)-MRSA Patientenisolats, sowie ein lokales MSSA Patientenisolat, das positiv für PVL (Panton-Valentine Leukozidin) getestet wurde. Als Beleg für die Tatsache, daß auch in unseren Breiten durchaus PVL-positive MSSA Stämme vorkommen und diese unter Umständen auch ein erhöhtes pathogenes Potential aufweisen können, hier der entsprechende

**Fallbericht von Kollegen Dr. Jürgen Wenzel** (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universitätsklinik Regensburg):

Das besagte Isolat wurde aus bronchoalveolärer Lavage (BAL) eines **12-jährigen Jungen** isoliert. Der Patient erkrankte mit grippeähnlichen Symptomen und **verstarb noch am gleichen Tag** in einer Kinderklinik trotz maximaler intensivmedizinischer Versorgung an **einer fulminanten nekrotisierenden Pneumonie**. Post mortem gelang die kulturelle Anzucht und Identifizierung eines Methicillin-sensiblen, PVL-positiven *Staphylococcus aureus* (positiver PCR-Nachweis des *S. aureus*-spezifischen pSa442-Gens; PCR *mecA*-Gen negativ; positiver PCR-Nachweis des LukS-PV Gens). Die molekulare Feintypisierung ergab spa-Typ t044, MLST-Typ ST-80 und agr Gruppe 3, Typ R VI-A8. Interessanterweise lag eine respiratorische Koinfektion mit Parainfluenzavirus Typ 1 vor. Für interessierte Kollegen hier der Literaturverweis für den entsprechend ausführlicheren Case Report, der auch gerne über den Ringversuchsleiter als pdf-file angefordert werden kann: Wenzel JJ, Hentschel J, Silvis W, Permanetter W, Mattes J, Kochanowski B, Herterich R, Jilg W, Linde HJ (2009) Rapidly fatal necrotizing pneumonia in a 12-year-old boy caused by co-infection with parainfluenza virus type 1 and Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. *Infection* **37**:75-77.

Dies nur als weiterer Beleg für die Tatsache, daß jeder Ringversuchsteilnehmer auch einem MSSA Isolat mit ähnlichem pathogenen Potential beim routinemäßigen MRSA Scening begegnen könnte – und es trotz auffälliger Klinik als solches vermutlich unerkant bleiben würde, solange die aufwendige molekularbiologische PVL-Testung im diagnostischen Ablaufschema eines mikrobiologischen Labors nur auf MRSA-Isolate beschränkt ist.

Aber nun zurück zur Diskussion der Ringversuchsergebnisse. Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt Probe # 92901 des aktuellen Ringversuchs ein Gemisch aus diesem "interessanten" *S. aureus* Isolat (MSSA, PVL-positiv,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml) und einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-negativ,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/ml). Probe # 92902 enthielt eine relativ hohe Menge eines typischen cMRSA Isolats (cMRSA, PVL-positiv,  $\sim 1 \times 10^6$  CFU/mL, spa-Typ t310). Die Probe # 92903 enthielt das gleiche PVL-positive cMRSA Isolat in einer etwa hundertfach geringeren Menge ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL), und die letzte der 4 Proben enthielt diesmal ein Methicillin-resistentes Isolat einer koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (# 92904; *S. epidermidis*; *mecA*-positiv,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml).

Für die MRSA-positive Probe # 92902 wurden von fast allen der insgesamt 156 Teilnehmer durchwegs korrekte Resultate mitgeteilt (siehe Tabelle 2). Angesichts der relativ hohen Menge an Zielorganismen kann die Mitteilung eines falsch-negativen Ergebnisses bei dieser Probe nicht mit mangelnder Sensitivität entschuldigt werden. Selbst wenn das entsprechende Zertifikat erteilt werden sollte (ein falsches Ergebnis bei den 4 Einzelproben wird ja bekanntermaßen toleriert), so sollten die 4 Teilnehmer mit falsch-negativem Ergebnis und der eine Teilnehmer mit dem als "fraglich" klassifizierten Befund bei Probe # 92902 diesen Ringversuch zum Anlaß nehmen, um die Auswahl ihres Testsystems zu hinterfragen und die Funktionalität ihrer Testkomponenten sicherzustellen. Im Gegensatz zu manch vorhergegangenem Ringversuch handelt es sich bei diesem Stamm definitiv nicht um ein MRSA-Isolat mit exotischer Genkonstellation, seltenen bzw. atypischen SCCmec Kassettypen oder Sequenzvarianten innerhalb der der populären Markergene für PCR-gestützte Nachweisverfahren.

Für die MRSA-positive Probe # 92903 mit ca. hundertfach geringerer Menge an Zielorganismen ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/mL) wurden dagegen lediglich von 111 Teilnehmern richtige Ergebnisse mitgeteilt. Von 6 Teilnehmern wurde das Ergebnis als "fraglich" klassifiziert und 39 Teilnehmer berichteten ein negatives Ergebnis für diese Probe. Hier scheint, zumindest bei manchen der eingesetzten Testsysteme, die untere Nachweisgrenze erreicht oder sogar bereits etwas unterschritten zu sein. Im Rahmen der detaillierten Ringversuchsauswertung wurden bei dieser Probe, vermutlich aus

Sensitivitätsgründen, von Laboratorien mit dem Genotype MRSA direct Test von 16 der insgesamt 34 Teilnehmer, mit dem LC MRSA Advanced Test von 4 der insgesamt 12 Teilnehmer und von Laboratorien mit dem Hyplex StaphyloResist durchwegs von allen der 7 Teilnehmer falsch-negative Ergebnisse für die schwach positive Probe # 92903 mitgeteilt. Von den beiden Teilnehmern, die die Verwendung von LightCycler Kits aufgeführt haben, wurden jeweils "fragliche" Ergebnisse für diese Probe mitgeteilt. Aus praktischer Sicht erscheint dies unter bestimmten Aspekten sehr wohl problematisch, da im Gegensatz zur molekulargenetischen "Kulturbestätigung" beim dezidierten Einsatz von Nukleinsäure-gestützten Verfahren zum Direktnachweis von MRSA aus Abstrichmaterial die erreichbare analytische Sensitivität der Testverfahren (inklusive dem gesamten Procedere der Probenaufarbeitung, DNA-Extraktion und Detektion) für die Klassifizierung des untersuchten Patienten als MRSA positiv oder negativ entscheidend sein kann. Dies gilt zumindest für den Zeitraum von ein bis drei Tagen nach Probeneingang – solange, bis das Ergebnis der zeitgleich angelegten Kultur vorliegt.

Aufgrund der insgesamt doch relativ geringen Menge an Zielorganismen wurde bei der Erstellung der Zertifikate ein negatives Ergebnis für MRSA bei der Probe # 92903 diesmal nicht als "falsch-negativ" bewertet. Der Ringversuchsleiter möchte aber dennoch seiner Hoffnung Ausdruck geben, daß die entsprechenden Teilnehmer die analytische Sensitivität ihrer Testsysteme überprüfen und bei vergleichbar schwach positiven Proben dann bei kommenden Ringversuchsrunden im Durchschnitt etwas höhere Erfolgsraten zu beobachten sind.

Die MRSA-negative Probe # 92904 wurde erfreulicherweise nahezu von allen Teilnehmern korrekt befundet. Den 8 Teilnehmern mit falsch-positivem Ergebnis ist jedoch anzuraten, den workflow ihres jeweiligen Testsystems sicherheitshalber auf mögliche Verschleppung von hochpositivem Probenmaterial während der Probenaufarbeitung oder während der Komplettierung entsprechender NAT-Reaktionsansätze abzuprüfen.

Auch für die Probe # 92901 mit einer Mischung aus dem PVL-positiven MSSA und einem *mecA*-negativen *S. epidermidis* wurde von der Mehrzahl der Teilnehmer ein richtig negatives Ergebnis berichtet. Interessanterweise wurden bei dieser Probenkonstellation von 3 Teilnehmern mit eigenentwickelten Testsystemen, die auf einer getrennten Erfassung von *S. aureus*-spezifischen Markern und dem *mecA* Gen beruhen, falsch-positive Ergebnisse mitgeteilt. Da mit diesen Testsystemen die Anwesenheit des *mecA* Gens in der Regel in einem getrennten Reaktionsansatz nachgewiesen wird, und die Probenkonstellation diesmal aber keine Methicillin-resistenten Staphylokokken (also auch kein *mecA* Gen) enthielt, verwundern sowohl die 4 positiven Ergebnisse wie auch die 3 als "fraglich" klassifizierten Ergebnisse für Probe # 92901. Darunter befinden sich diesmal auch einer der insgesamt 7 Teilnehmer mit dem kommerziellen Hyplex StaphyloResist Testsystem sowie drei Teilnehmer mit eigenentwickeltem (*in house*) Testkonzept zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen *S. aureus* Markern und dem *mecA* Gen. Zumindest die 4 Teilnehmer, die diese Probe als "MRSA positiv" bewertet haben, sollten die Spezifität ihrer Testsysteme vor allem hinsichtlich des *mecA* Gen-Nachweises überprüfen.

Insgesamt betrachtet 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 45 der insgesamt 156 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt und bei 36 Teilnehmern waren die Ergebnisse für die molekularbiologische PVL-Testung durchwegs korrekt. Nähere Informationen zu der nach wie vor hochaktuellen cMRSA bzw. CA-MRSA Problematik finden sich beispielsweise unter: Linde, H.J. und N. Lehn

(2005) Dtsch. Med. Wochenschr. 130:2397-2401, oder Witte, W. et al. (2005) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 24:1-5. Ein gut evaluiertes *real-time* PCR Protokoll für den gezielten Nachweis von PVL-positiven *S. aureus* Isolaten findet sich beispielsweise in: Eur. J. Clin. Microbiol. Inf. Dis. (2007) **26**:131-135.

### **Brief discussion of the current EQAS results in English:**

#### **RV 539: MRSA**

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

To evaluate the analytical specificity of the MRSA-specific test systems, the current set contained a typical CA-MRSA isolate in two different concentrations, a methicillin-resistant coagulase-negative *Staphylococcus* strain (*S. epidermidis*) and a mixture of *S. epidermidis* and an "uncommon" methicillin-susceptible but **PVL-positive** isolate of *S. aureus* (**cMSSA**), which was grown from a German patient at the University hospital of Regensburg. The latter strain is associated with an interesting case report, recently published in the journal "Infection" by my colleague Dr. Jürgen Wenzel (Institute of Medical Microbiology, University Hospital Regensburg): Wenzel JJ, Hentschel J, Silvis W, Permanetter W, Mattes J, Kochanowski B, Herterich R, Jilg W, Linde HJ (2009) Rapidly fatal necrotizing pneumonia in a 12-year-old boy caused by co-infection with parainfluenza virus type 1 and Panton-Valentine leukocidin (PVL)-positive methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus*. Infection **37**:75-77.

Briefly, this paper documents that *S. aureus* has a well-defined role as a causative agent of community-associated soft-tissue and skin infections. However, during more recent years, a growing body of evidence suggests that community-associated methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* is responsible for a series of cases of severe necrotizing pneumonia in otherwise healthy children and young adults. This emerging clinical entity is characterized by fast disease progression and high mortality (55%–65%). Two factors are currently thought to be primarily responsible for these features: (1) most of the *S. aureus* strains involved in the fatal cases carry the genes for the bacterial exotoxin PVL, and (2) many cases were preceded by a period of influenza-like illness (ILI), suggesting viral bacterial co-infection. The important role of PVL for the pathogenesis of *S. aureus*-associated necrotizing pneumonia in vivo was demonstrated recently. However, the action of PVL alone may not explain the high mortality rates observed. A second pathophysiologically important feature of PVL-positive *S. aureus* is its increased ability to bind to damaged airway epithelium. It has been suggested that an initial damage of the epithelium is a prerequisite for the development of severe necrotizing *S. aureus* pneumonia...

Sample # 92901 of the current set contained a mixture of a methicillin-susceptible *S. aureus* isolate (MSSA, PVL-positive,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml) and a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-negative,  $\sim 5 \times 10^4$  CFU/ml). Correct (negative) results were reported by 149 of the 156 participating laboratories. Three of the 4 participants who reported false-positive results and 2 of the 3 participants who reported "questionable" for sample # 92901 indicated the use of assay concepts for the independent detection of the *mecA* gene and a *S. aureus* species marker gene. As this particular sample has not contained any staphylococcal species carrying the *mecA* gene, these



participants should carefully check the specificity of their assay concepts – especially the assay components used for the detection of the *mecA* gene. One sample of the current set (# 92904) contained only a CoNS strain (*S. epidermidis*; *mecA*-positive,  $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml). For this sample, negative results were reported by 148 of the 156 participants. Laboratories who have reported a positive MRSA result should check their workflow for contamination events in the course of sample preparation, amplification or amplicon detection.

Sample # 92902 contained a relatively high number of typical CA-MRSA organisms (*S. aureus*, *mecA*-positive, PVL-positive,  $\sim 1 \times 10^6$  CFU/ml). With the exception of 4 participants, this sample was tested positive by the MRSA-specific NAT assays at all participating laboratories. Sample # 92903 contained an approximately hundredfold lower amount of the same cMRSA strain ( $\sim 1 \times 10^4$  CFU/ml). With this sample, it seems that we have touched the limit of detection of some assay concepts. Only 111 participants reported correct results and false-negative results were reported by 39 laboratories. A detailed analysis of the completed result forms revealed that (probably due to analytical sensitivity issues), 16 of 34 laboratories using the Genotype MRSA direct test, 4 of the 12 laboratories using the LC MRSA Advanced Test, and all 7 laboratories using the Hyplex StaphyloResist assay reported false-negative results for the weak-positive sample # 92903. Especially with respect to their implication as screening tests performed at the time of admission of a patient at risk for MRSA infection, PCR assays for the direct detection of MRSA in clinical samples should be as sensitive as possible. Since all efforts should be made to achieve a reasonable analytical sensitivity for the corresponding target organism, the affected laboratories should consider to improve their PCR protocols and their diagnostic workup. Except the analytical sensitivity issue with the MRSA organisms in sample # 92903, 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 # 92901, # 92902, and # 92904.

Molecular detection of the *lukF/S-PV* gene was performed by 45 of the 156 participating laboratories and 36 laboratories correctly classified the strains in samples # 92901, # 92902 and # 92903 as PVL positives.

## PCR-/NAT MRSA / cMRSA (RV 539) November 2009



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
92901	∅	62 /71, 72, 73	cMSSA + CoNS ( <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> ; oxa <sup>S</sup> , PVL-pos) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
92902	++	61 /71, 72	cMRSA spa t 310 ( <i>S. aureus</i> , oxa <sup>R</sup> , PVL-pos) (~ 1x10 <sup>6</sup> CFU/mL)
92903	(+)	61 /71, 72	cMRSA spa t 310 ( <i>S. aureus</i> , oxa <sup>R</sup> , PVL-pos) (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)
92904	∅	62 /73	CoNS ( <i>S. epidermidis</i> ; oxa <sup>R</sup> ) (~ 1x10 <sup>4</sup> CFU/mL)

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

n = 156	Probennummer (Sample no.)				Inhibition				
	92901	92902	92903	92904	92901	92902	92903	92904	
<b>Befund</b> <i>Result</i>									
<b>Positiv</b>	4	151 <sup>1)</sup>	111 <sup>1)</sup>	8	n.d.	1	1	1	1
<b>Negativ</b>	149	4	39 <sup>2)</sup>	148	nein <i>no</i>	154	155	155	155
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	3	1	6	0	ja <i>yes</i>	1	0	0	0

**Tabelle 3: Häufigkeit richtig positiver und richtig negativer NAT-Befunde bei Anwendern verschiedener Methoden.** *Absolute numbers and relative frequency of reported true positive and true negative results among various NAT methods.*

NAT-Methode [Code] (total number *)	NAT richtig positiv <i>True positive results</i>			NAT richtig negativ <i>True negative results</i>		
	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%	Absolut <i>Absolute</i>	Relativ <i>Relative</i>	%
BD GeneOhm MRSA [20] (n=37)	65	65 / 73 <sup>§</sup>	89	71	71 / 74	96
GenoType MRSA Direct [21] (n=34)	54	54 / 66 <sup>§</sup>	82	68	68 / 68	100
Hyplex <i>StaphyloResist</i> [22] (n=7)	7	7 / 14	50	14	14 / 14	100
LightCycler Kits [23] (n=2)	2	2 / 2 <sup>§</sup>	100	4	4 / 4	100
GeneXpert (Cepheid) [24] (n=28)	56	56 / 56	100	55	55 / 55 <sup>§</sup>	100
LC MRSA Advanced (Roche) [25] (n=12)	20	20 / 24	83	23	23 / 24	96
Commercial assay kit [27] (n=8)	12	12 / 16	75	14	14 / 15 <sup>§</sup>	93
<i>In house</i> PCR assay [28] (n=33)	56	56 / 64 <sup>§</sup>	88	58	58 / 65 <sup>§</sup>	89
Andere / k.A. / other [29] (n=5)	9	9 / 10	90	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.*

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

**Comments:**    <sup>1)</sup> cMRSA identification (*lukFS* gene detection) was performed by 45 laboratories. 36 of them reported correct results for the two CA MRSA-positive samples.  
                  <sup>2)</sup> 39 of the 156 participants reported negative results for sample # 92903. Due to the low number of target organisms we have not rated them as "false-negative", but the participants may consider to improve the analytical sensitivity of their corresponding PCR assays.



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

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

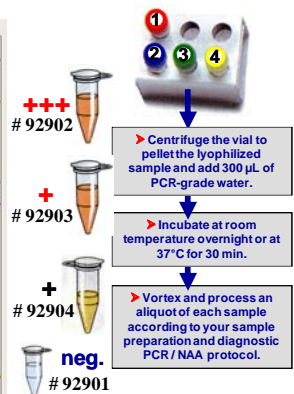
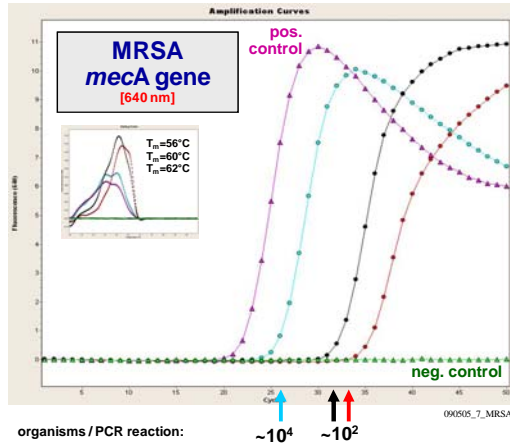
Reischl / Linde / Wolf

- 7 92901
- 8 92902
- 9 92903
- 10 92904
- 11 Pos. Ko. mecA
- 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-I03\_II/09



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>



**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

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

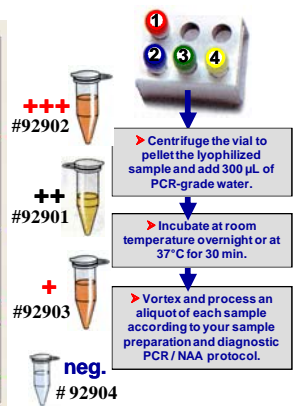
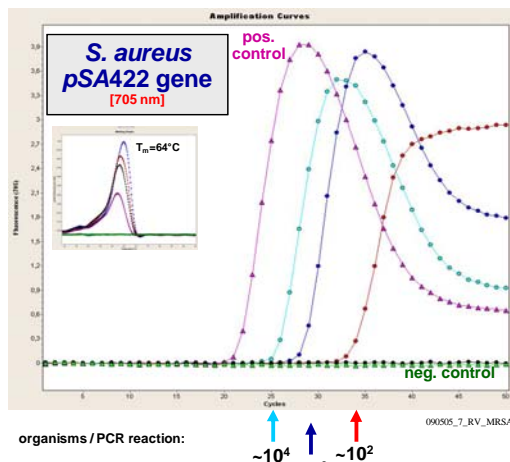
Reischl / Linde / Wolf

- 13 92901
- 14 92902
- 15 92903
- 16 92904
- 17 Pos. Ko. pSA
- 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-I04\_II/09



**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

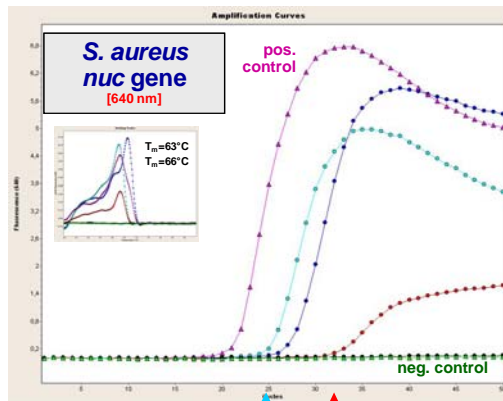
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Lehn / Wolf

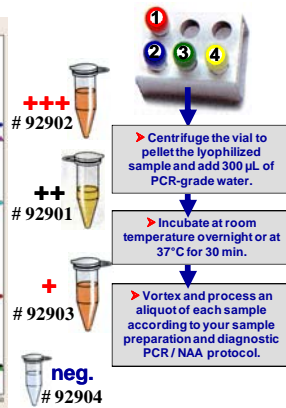
19	92901	26,54
20	92902	24,04
21	92903	31,04
22	92904	
23	Pos. Ko. nuc	20,16
24	NTC	



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



organisms / PCR reaction:  $\sim 10^4$   $\sim 10^3$   $\sim 10^2$



IN STAND-I05\_II/09



**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

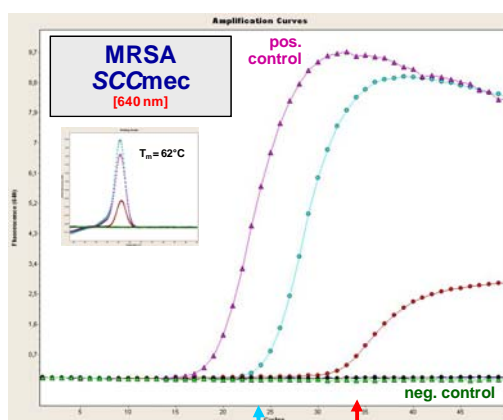
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

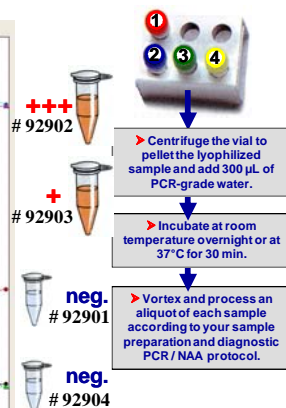
1	92901	
2	92902	23,83
3	92903	31,14
4	92904	
5	Pos. Ko. SCC	18,22
6	NTC	



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



organisms / PCR reaction:  $\sim 10^4$   $\sim 10^2$



IN STAND-I06\_II/09



**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

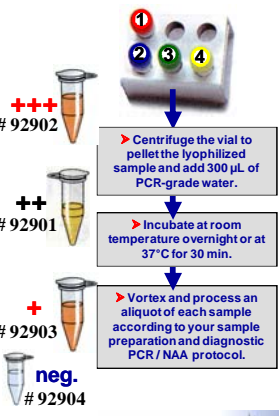
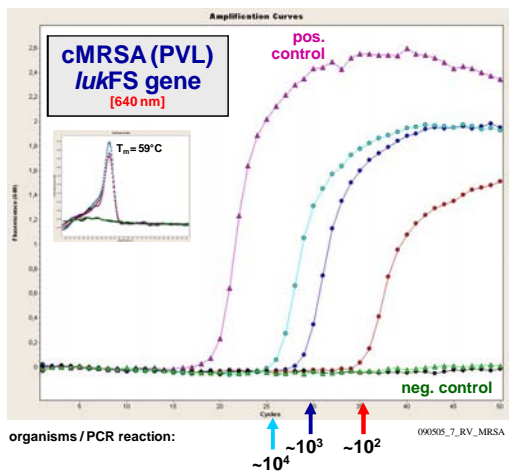
**Evaluation (quantitative Real-Time PCR):**

Reischl / Linde / Wolf

7	92901	27,17
8	92902	24,32
9	92903	33,68
10	92904	
11	Pos. Ko. Luk	17,81
12	NTC	



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



INSTAND-I07\_II/09



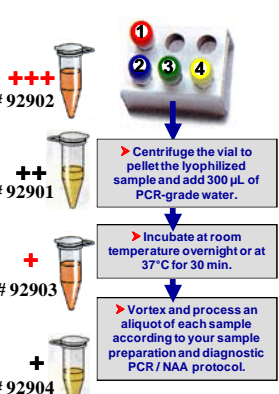
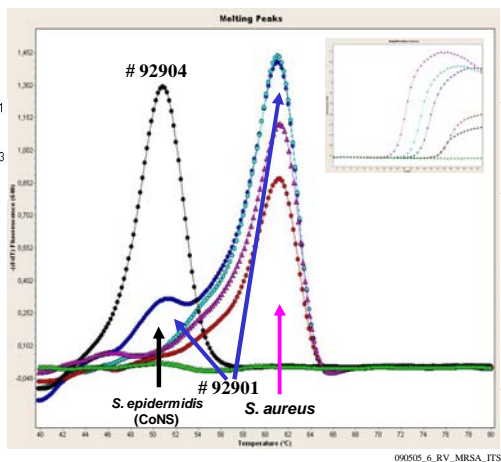
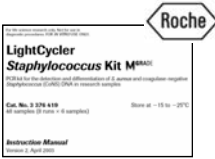
**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

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

Reischl / Lehn / Wolf

**Staphylococcus LightCycler Kit**  
 [640 nm]

7	92901	61,03	51,01
8	92902	60,98	
9	92903	61,10	
10	92904		50,83
11	pos. Control Staph ITS	61,18	
12	NTC		



INSTAND-I 09\_II/09



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>

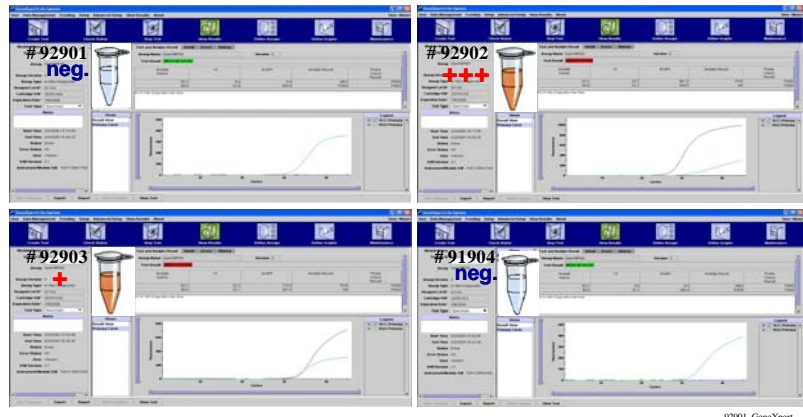


## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2009

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

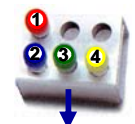
Reischl / Linde / Wolf

**Xpert™ MRSA**



INSTAND-I10\_II/09

92901\_GeneXpert



- 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.



Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene  
 Universität Regensburg, FJS-Allee 11, 93053 Regensburg  
<http://www.udo-reischl.de>

INSTAND e. V.  
 Gesellschaft zur Förderung der Qualitätssicherung  
 in medizinischen Laboratorien e.V.  
<http://www.instand-ev.de>

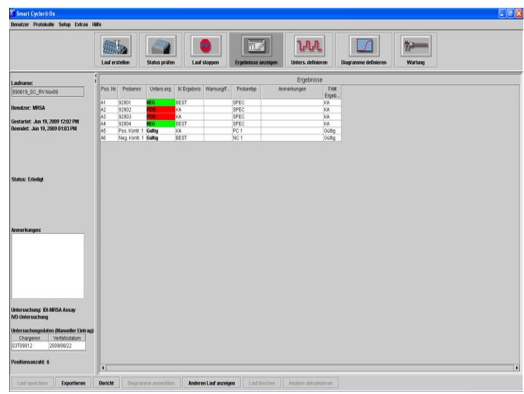


## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA status 11.2009

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

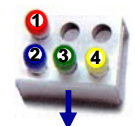
Reischl / Linde / Wolf

**BD GeneOhm MRSA Test**



INSTAND-I11\_II/09

92901\_BD\_GeneOhm.jpg



- 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.





**539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA** status 11.2009

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

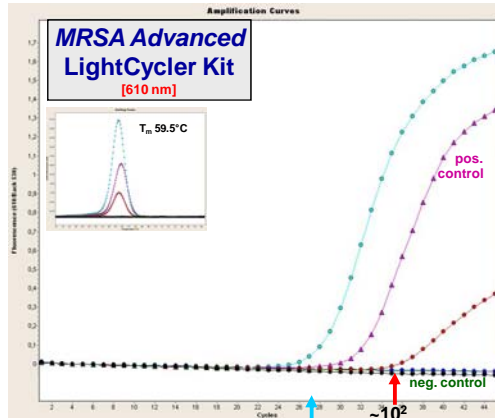
Reischl / Lehn / Wolf

1	#PCH#	31,20
2	#NC#	
3	92901	
4	92902	27,48
5	92903	34,77
6	92904	

Sample ID	Sample Name	Sample Type	Sample Status
1	92901	92901	OK
2	92902	92902	OK
3	92903	92903	OK
4	92904	92904	OK



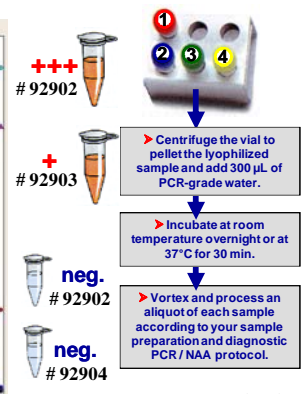
MRSAAdvanced Kit



organisms / PCR reaction:

$\sim 10^4$

$\sim 10^2$



U. Reischl/RIMM/H09.2009





# Rapidly Fatal Necrotizing Pneumonia in a 12-Year-Old Boy Caused by Co-Infection with Parainfluenza Virus Type 1 and Panton-Valentine Leukocidin (PVL)-Positive Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus*

A 12-year-old boy was admitted to the Children's Hospital St. Marien (Landshut, Germany) with clinical signs of dyspnea, cyanosis, and hemoptysis. No history of recent travel, pre-existing conditions, or earlier signs of infection, including skin-soft tissue infections, were reported. The boy's temperature was 37.2 °C. Upon examination, his throat appeared reddened and the tonsils enlarged. Bilateral rhonchi with rales and decreased breath sounds on the right side of the chest were present. All other clinical findings were within the normal range. The oxygen saturation was 90% while breathing 5 l/min O<sub>2</sub>. Arterial blood gases on admission were pH 7.4, p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> 37.8 mmHg, p<sub>a</sub>O<sub>2</sub> 56 mmHg, base excess -1.9 mmol/l. Initial laboratory data included a white blood cell (WBC) count of 1.9/nl, a red blood cell (RBC) count of 4.56/pl, hemoglobin at 12.3 g/dl, a hematocrit of 36.8%, a platelet count of 243/nl, a C-reactive protein (CRP) level of 44 mg/l, and a serum creatinine level of 88 µmol/l. A chest radiograph revealed atelectasis of the right upper lung and dense infiltrates of the entire right lung (Figure 1a). Following his admission to the intensive care unit of the hospital, the patient was administered cefuroxime and prednisone intravenously, and fluid resuscitation was started. Four hours after admission, the boy's condition deteriorated. He became increasingly dyspneic (oxygen saturation < 90%) despite increased oxygen substitution, and tracheal intubation was performed. Ventilation proved to be difficult, and blood was repeatedly suctioned from the endotracheal tube. The oxygen saturation decreased to values below 70%, and severe bradycardia developed. Cardiopulmonary resuscitation was initiated approximately 6 h after admission. A chest radiograph revealed a massive increase of infiltrates in the right lung and signs of distension of the left lung (Figure 1b). Despite intensified measures, bradycardia and low oxygen saturation remained. Laboratory test results at this stage were pH 6.4, p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> 200 mmHg, p<sub>a</sub>O<sub>2</sub> 10.9 mmHg, base excess -31.6 mmol/l, WBC count 3.7/nl, platelet count 36/nl, and CRP 65 mg/l. After 50 min, cardiopulmonary resuscitation was discontinued, and the boy was pronounced dead.

Necropsy results showed a confluating and focally fusing pronounced hemorrhagic bronchopneumonia of the whole right lung and parts of the left lung. Microscopic analysis revealed lung tissue with extensive intra-alveolar hemorrhage, accumulation of polymorphonuclear leukocytes, and large clusters of cocci (Figure 1c). Marked hemorrhagic necrosis of the trachea and bronchial tree was diagnosed.

Post-mortem microbiology laboratory test results revealed blood cultures and tracheal secretion samples positive for Panton-Valentine leukocidin-positive (PVL<sup>+</sup>) methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* (confirmed by PCR-based detection of the *S. aureus*-specific genomic fragment Sa442, the *mecA* gene [1] (negative), and positive amplification of the *LukS-PV* gene [2]). The strain was identified as *spa*-type t044 (<http://www.ridom.de/>),

Infection 2009; 37: 75–77  
DOI 10.1007/s15010-008-8214-9

---

**J.J. Wenzel** (corresponding author)

Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Regensburg, Franz-Josef-Strauß-Allee 11, 93053, Regensburg, Germany; Phone: (+49/941) 944-6462; Fax: -6402  
e-mail: juergen.wenzel@klinik.uni-regensburg.de

**J. Hentschel**

Children's Hospital St. Marien, Landshut, Germany

**W. Silvis**

Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Regensburg, Regensburg, Germany

**W. Permanetter**

Institute of Pathology, Klinikum Landshut, Landshut, Germany

**J. Mattes, B. Kochanowski**

Microbiology Laboratory Dr. Mattes Dr. Kochanowski, Neuötting, Germany

**R. Herterich**

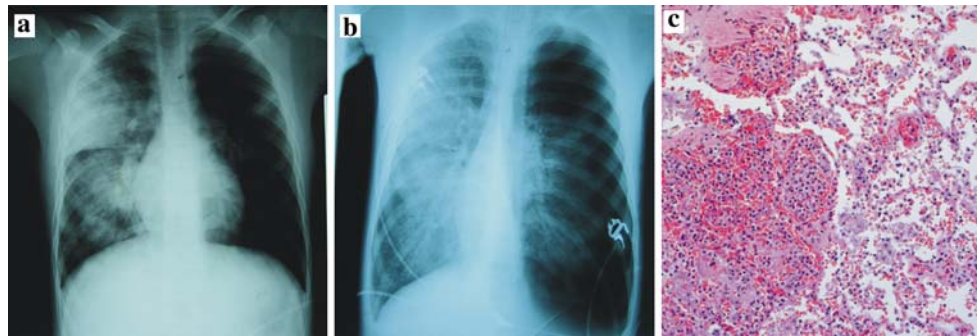
Children's Hospital St. Marien, Landshut, Germany

**W. Jilg, H.J. Linde**

Institute for Medical Microbiology and Hygiene, University of Regensburg, Regensburg, Germany

Received: May 29, 2008 · Revision accepted: August 1, 2008  
Published online: December 5, 2008

**Figure 1.** Chest radiograph of the 12-year-old boy obtained on admission (a) and 6 h later (b). (c) Histopathological findings with characteristic signs of confluating and focally fusing pronounced hemorrhagic bronchopneumonia.



MLST-type ST-80 (<http://www.mlst.net/>), and *agr* group 3, type R VI-A8 [3], respectively. The isolate was fully susceptible to penicillin, oxacillin, and various other classes of antimicrobials (according to Clinical and Laboratory Standards Institute standards). PCR testing of the tracheal secretions for influenza type A and B virus, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, and mycobacteria was negative. Interestingly, further laboratory investigation revealed a positive test result for parainfluenza virus type 1 RNA by reverse transcription quantitative PCR ( $> 10^5$  genome equivalents/ml bronchoalveolar fluid; in-house method). Negative PCR results were found for respiratory syncytial virus, herpes simplex virus type 1 and 2, influenza type A and B virus, adenovirus, and parainfluenza virus type 2 and 3.

*S. aureus* has a well-defined role as a causative agent of community-associated soft-tissue and skin infections. However, during more recent years, a growing body of evidence suggests that community-associated methicillin-sensitive and methicillin-resistant *S. aureus* is responsible for a series of cases of severe necrotizing pneumonia in otherwise healthy children and young adults [4–6]. This emerging clinical entity is characterized by fast disease progression and high mortality (55%–65%) [7]. Two factors are currently thought to be primarily responsible for these features: (1) most of the *S. aureus* strains involved in the fatal cases carry the genes for the bacterial exotoxin PVL, and (2) many cases were preceded by a period of influenza-like illness (ILI), suggesting viral bacterial co-infection. Gillet et al. [7] identified factors predicting mortality for cases of severe necrotizing pneumonia. Three key clinical signs were associated with fatal outcome: erythroderma, airway bleeding, and leukopenia. The important role of PVL for the pathogenesis of *S. aureus*-associated necrotizing pneumonia *in vivo* was demonstrated only recently [8]. However, the action of PVL alone may not explain the high mortality rates observed. A second pathophysiologically important feature of PVL<sup>+</sup> *S. aureus* is its increased ability to bind to damaged airway epithelium [8]. It has been suggested that an initial damage of the epithelium is a prerequisite for the development of severe necrotizing *S. aureus*

pneumonia. Indeed, this hypothesis is in line with the observation that the majority of the patients have reported preceding ILI. It is very likely that influenza virus infection is able to provide the grounds on which PVL<sup>+</sup> *S. aureus* pneumonia can develop to the often fatal “mayhem in the lung” [8, 9]. Moreover, secreted staphylococcal proteases are able to potentiate the pathogenicity of influenza viruses by cleaving and activating viral surface hemagglutinin. Vice versa, the consecutive exacerbation of viral airway epithelium damage promotes bacterial spread [9]. The role of other viruses in this regard has yet to be defined. A key characteristic of our case is the peracute time course from onset of the first ILI symptoms to death due to necrotizing pneumonia in less than 24 h. Intriguingly in this context, the positive PCR test result for parainfluenza virus type 1 suggests a role in the pathogenesis and progression of severe necrotizing pneumonia. In the majority of cases reported in the literature, virological laboratory analyses, if any, were limited to rapid antigen tests for influenza, which are known for their suboptimal sensitivity. Only in some instances were tests also performed for other respiratory viruses, making it likely that there is a high proportion of cases with unreported viral involvement.

Based on our observations, we believe it is important to (1) consider viral *S. aureus* co-infection in unusual cases of severe pneumonia in children and young adults, (2) test for the presence of PVL genes in *S. aureus* isolates, (3) include diagnostic tests for a spectrum of viral respiratory pathogens—with a focus on influenza and parainfluenza viruses—in order to further define their role in this disease entity, and (4) adjust antimicrobial and adjunctive therapy accordingly [10].

J.J. Wenzel, J. Hentschel, W. Silvis, W. Permanetter,  
J. Mattes, B. Kochanowski, R. Herterich,  
W. Jilg, H.J. Linde

#### Acknowledgments

We thank Udo Reischl and Holger Melzl for support with the molecular typing procedures.

## References

1. Reischl U, Linde HJ, Metz M, Leppmeier B, Lehn N: Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous species confirmation using real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol* 2000; 38: 2429–2433.
2. Reischl U, Tuohy MJ, Hall GS, Procop GW, Lehn N, Linde H: Rapid detection of Panton-Valentine leukocidin-positive *Staphylococcus aureus* by real-time PCR targeting the lukS-PV gene. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2007; 26: 131–135.
3. Gilot P, Lina G, Cochard T, Poutrel B: Analysis of the genetic variability of genes encoding the RNA III-activating components Agr and TRAP in a population of *Staphylococcus aureus* strains isolated from cows with mastitis. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 4060–4067.
4. Gillet Y, Issartel B, Vanhems P, Fournet JC, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Piémont Y, Brousse N, Floret D, Etienne J: Association between *Staphylococcus aureus* strains carrying gene for Panton-Valentine leukocidin and highly lethal necrotising pneumonia in young immunocompetent patients. *Lancet* 2002; 359: 753–759.
5. Hageman JC, Uyeki TM, Francis JS, Jernigan DB, Wheeler JG, Bridges CB, Barenkamp SJ, Sievert DM, Srinivasan A, Doherty MC, McDougal LK, Killgore GE, Lopatin UA, Coffman R, MacDonald JK, McAllister SK, Fosheim GE, Patel JB, McDonald LC: Severe community-acquired pneumonia due to *Staphylococcus aureus*, 2003–04 influenza season. *Emerg Infect Dis* 2006; 12: 894–899.
6. Centers for Disease Control and Prevention (CDC): Severe methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* community-acquired pneumonia associated with influenza—Louisiana and Georgia, December 2006–January 2007. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2007; 56: 325–329.
7. Gillet Y, Vanhems P, Lina G, Bes M, Vandenesch F, Floret D, Etienne J: Factors predicting mortality in necrotizing community-acquired pneumonia caused by *Staphylococcus aureus* containing Panton-Valentine leukocidin. *Clin Infect Dis* 2007; 45: 315–321.
8. Labandeira-Rey M, Couzon F, Boisset S, Brown EL, Bes M, Benito Y, Barbu EM, Vazquez V, Höök M, Etienne J, Vandenesch F, Bowden MG: *Staphylococcus aureus* Panton-Valentine leukocidin causes necrotizing pneumonia. *Science* 2007; 315: 1130–1133.
9. Tashiro M, Ciborowski P, Klenk HD, Pulverer G, Rott R: Role of *Staphylococcus* protease in the development of influenza pneumonia. *Nature* 1987; 325: 536–537.
10. Morgan MS: Diagnosis and treatment of Panton-Valentine leukocidin (PVL)-associated staphylococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents* 2007; 30: 289–296.