



INSTITUT FÜR MEDIZINISCHE  
MIKROBIOLOGIE UND HYGIENE

UNIVERSITÄT REGENSBURG

DIREKTOR: PROF. DR. HANS WOLF

WHO Collaborating Centre  
for Research and Control of  
Virus-associated Cancers



WHO Collaborating Centre  
for Reference and Research  
on Viral Hepatitis



PD DR. UDO REISCHL, TEL: (0941) 944-6450 FAX: -6402

MOLEKULARE DIAGNOSTIK

Regensburg, den 27. Oktober 2006

**An die Teilnehmer  
der INSTAND-Ringversuche Bakteriengenomnachweis PCR / NAT  
(INSTAND-Ringversuchsnummern 530 bis 540)**

**Dear Participant, dear Colleague,**

*Please find a cover letter in English on page 2 of this document and  
tables with the results in a bilingual style after the discussion in German language.*

**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**

**Prof. Dr. N. Lehn**

**Prof. Dr. E. Straube**

**Prof. Dr. M. Maaß**

To the participants of the  
INSTAND-Proficiency Test in  
Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)  
(INSTAND Proficiency Test Numbers 530 to 540)

**Dear Participant, dear Colleague,**

Please find enclosed a brief analysis report of the recent proficiency test panel "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)". It summarizes some benchmarks and the overall assessment of results reported by all of the the participating laboratories.

The accuracy of your individual results is indicated on your personal certificate issued by INSTAND e.V. (attached to this letter).

This highly desired program for external validation was activated in 2002 by the *German Society of Hygiene and Microbiology* (DGHM) and is now organized by INSTAND e.V., Düsseldorf, Germany. As you can learn from "[www.instand-ev.de](http://www.instand-ev.de)", this new segment of their huge proficiency testing program is now open for diagnostic laboratories worldwide. We are aiming at two validation rounds per year (April / September), a reasonable price of less than €150 per set, and a permanently expanding coverage of relevant bacterial pathogens. Any general or specific comments on sample composition or suggestions on additional bacterial, fungal, or parasitic organisms which should be covered, are highly appreciated.

Please do not feel irritated by some strong-positive samples among the present set. To make participants and ourselves familiar with the concept and the suitability of the proprietary sample matrix, "passing" should be easy in the initial rounds of proficiency testing. But now as the program continues, it is our challenge (and duty) to rise at least some of the hurdles with every round of external validation.

Further information as well as the documented and analyzed results of the past rounds of our proficiency test program "Bacterial Genome Detection (PCR / NAT)" can be downloaded in form of pdf-files at "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)", subsection "INSTAND Ringversuche (PCR / NAT)". Although the preferred language of these documents is German, we are aiming to provide at least some key documents and the tables in a bilingual style.

Hopefully you found this kind of external validation benefitting and you will continue to join the future rounds of our QC program in bacterial genome detection (NAT/ PCR).

With best personal regards,



**Dr. Udo Reischl**

Organizer of the proficiency testing program "Bacterial Genome Detection"  
Member of the Quality Assurance Board (DGHM; German Society of Hygiene and Microbiology)

Prof. Dr. H. Wolf      Prof. Dr. N. Lehn      Prof. Dr. E. Straube      Prof. Dr. M. Maaß

## Gesamtübersicht und Auswertung der Ringversuchsergebnisse aller Teilnehmer

### SEPTEMBER 2006:

Entsprechend des Grundgedankens unserer Ringversuchsaktivitäten wurde auch bei der Konzeption des aktuellen Ringversuchs zum "Bakteriengenomnachweis mittels PCR oder anderer Nukleinsäureamplifikationstechniken (NAT)" bei einigen Zielorganismen der Versand von Proben mit relativ niedrigen bzw. als grenzwertig positiv zu betrachtenden Erregerzahlen angestrebt.

In den aktuellen Ringversuchssets befinden sich daher erneut einige Proben mit relativ geringer Menge folgender Zielorganismen: *Chlamydia trachomatis* (Proben # 62003, # 62102, und # 62103), *Neisseria gonorrhoeae* (Probe # 62001), EHEC (Probe # 62401), *Legionella pneumophila* (Probe # 62601), sowie *Chlamydia pneumoniae* (Proben # 63412 und # 63414). 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 prozentualem Anteil (Befundhäufigkeit) je Amplifikationssystem bzw. Testkonzept aufgeschlüsselt. Für die objektive Bewertung von kommerziellen Testsystemen sollten neben der rein statistischen Betrachtung der mitgeteilten Ringversuchsergebnisse auch die Anzahl und vor allem die methodische bzw. technische Qualifikation der individuellen Teilnehmer berücksichtigt werden. Da wir im Zuge unserer Ringversuche aber das gesamte Spektrum von spezialisierten Expertenlabors bis hin zum "Gelegenheitsanwender" abdecken, müssen die arithmetisch ermittelten Richtigkeitsquoten bei der Bewertung einzelner Testsysteme auch immer mit einem gewissen Toleranzbereich betrachtet werden.

Eine weitergehende systematische Aufschlüsselung nach den einzelnen Kategorien der DNA-Extraktion, Amplifikation, Detektion sowie den jeweils verwendeten Zielsequenzen ist bei diesem Ringversuch aufgrund der relativ hohen Richtigkeitsquote unter den eindeutig positiven Proben wenig sinnvoll. Die individuellen Angaben der einzelnen Teilnehmer zur Testdurchführung werden jedoch EDV-technisch erfasst und bleiben somit für retrospektive Analysen verfügbar.

Auch im Rahmen des hier diskutierten Ringversuchs waren wieder einige Auffälligkeiten hinsichtlich der Spezifität und Sensitivität von bestimmten Testkonzepten und der für den Nachweis verwendeten Zielsequenzen zu beobachten. Diese Aspekte sind bei der Auswertung des jeweiligen Ringversuchs aufgeführt und dort auch kurz diskutiert. Zusätzlich stehen für die früheren, für diesen und für alle folgenden Ringversuche eine Reihe zusätzlicher Informationen (wie die graphisch dokumentierten Ergebnisse unserer quantitativen *real-time* PCR Testsysteme oder die Ergebnisse einiger kommerziellen PCR Testsysteme) auch unter folgender Internetadresse: "[www.udo-reischl.de](http://www.udo-reischl.de)"; Unterpunkt "INSTAND-Ringversuche (PCR / NAT)" und neuerdings auch über die Homepage von INSTAND e.V. als *pdf*-Files zum freien Download bereit.

## RV 539: MRSA

Aufgrund zahlreicher Anfragen und einiger enttäuschter Teilnehmer des vorhergegangenen Ringversuchs RV 539 **eine wichtige Anmerkung vorab:** dieser Ringversuch ist ausschließlich für den **Direktnachweis von MRSA** aus geeignetem klinischem Untersuchungsgut (wie beispielsweise Nasenabstrichen) konzipiert. Die positiven Proben innerhalb des ausgesandten 4-er Sets enthalten daher typischerweise relativ geringe Mengen an entsprechenden Zielorganismen. Für interessierte Teilnehmer soll an dieser Stelle noch einmal explizit darauf hingewiesen werden, daß sich mit Testsystemen, die üblicherweise für die Kulturbestätigung von *S. aureus* und/oder MRSA ausgelegt sind, diese geringen Mengen nicht immer zuverlässig nachweisen lassen werden. Eine Teilnahme an diesem Ringversuch ist daher nur für solche diagnostische Laboratorien erfolgversprechend und sinnvoll, die hochsensitive und spezifische NAT/PCR-gestützte Verfahren zum Direktnachweis von MRSA etabliert haben bzw. im Zuge einer externen Qualitätskontrolle evaluieren wollen.

Der NAT-gestützte Direktnachweis von MRSA gewinnt im Umfeld der medizinischen Mikrobiologie zunehmend an Aktualität und Attraktivität, und es sind bereits von 3 namhaften Herstellern Testsysteme bzw. Testkits kommerziell verfügbar. Deren Verwendung wurde im Zuge dieses Ringversuchs systematisch abgefragt. Wie auch bereits im vorhergegangenen Ringversuch, so zeigt die Auswertung der aktuellen Ergebnisse auf eindrucksvolle Weise die spezifischen Limitationen der unterschiedlichen Testformate und -konzepte. Bedingt durch die diagnostische Fragestellung bestehen die spezifischen Anforderungen hier in einem möglichst sensitiven Nachweis von geringsten Mengen an Zielorganismen und gleichzeitig in der differenzierten Erfassung von *mecA*-positiven Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies.

Viele 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 des Methicillin-Resistenzgens innerhalb eines für *S. aureus* charakteristischen Genbereiches beruhen und die relativ gut konservierte Integrationsstelle der SCC*mec* Kasette im *S. aureus* Genom als Zielsequenz verwenden. Eine aktuelle Diskussion dieser Problematik findet sich beispielsweise in: Kola et al., "Workshop zum MRSA-Screening am 25.05.05 in Hannover", Mikrobiologie, 2005, 175-181.

Daß aber auch die SCC*mec*-basierten Testkonzepte gewisse Limitationen haben, konnte im Rahmen des vorhergegangenen Ringversuchs mit der Probe # 61904 eindrucksvoll aufgezeigt werden: dieses MSSA Isolat besaß zwar eine an den jeweiligen Enden typische SCC*mec* Sequenz, aber das üblicherweise innerhalb der SCC*mec* Kasette vorhandene *mecA*-Gen war hier deletiert.

Im Rahmen dieser Ringversuchsserie haben wir uns aber zum Ziel gesetzt, primär die analytische Sensitivität und Spezifität (und somit die Routinetauglichkeit) der jeweils eingesetzten Testsysteme abzu prüfen und die Teilnehmer nicht mit einer Reihe von sporadisch isolierten *S. aureus* Isolaten von zugegebenermaßen "exotischer" Genomkonstellation zu verunsichern. Daher befanden sich im aktuellen Ringversuch auch 2 Proben mit Mischungen aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken.

Wie in Tabelle 1 dargestellt, enthielt das aktuelle Set an Ringversuchsproben diesmal je eine Probe mit relativ hoher Menge an PVL-positiven MRSA (# 63903; MRSA, PVL-positiv,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), eine Probe mit einem PVL-negativen MRSA Isolat (# 63901; MRSA, PVL-negativ,  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml) und der gleichzeitigen Anwesenheit einer Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies (*S. epidermidis*; *mecA*-negativ), eine Probe mit einem *mecA*-negativen *S. aureus* Isolat und der gleichzeitigen Anwesenheit eines *mecA*-positiven *S. epidermidis* Stammes (# 63904; je  $\sim 1 \times 10^5$  CFU/ml), sowie eine Probe ohne Staphylokokken (# 63902; *E. coli*).

Für die negative Probe # 63902 und die "ausschließlich" MRSA-positive Probe # 63903 wurden von den insgesamt 82 Teilnehmern diesmal, unabhängig von dem jeweils eingesetzten NAT-gestützten Testsystem, bis auf ein isoliert falsch-negatives Ergebnis für Probe # 63903 durchwegs korrekte Ergebnisse mitgeteilt.

Die Ergebnislage bei den beiden anderen Proben mit einer Mischung aus *S. aureus* und Koagulase-negativen Staphylokokken gestaltet sich jedoch etwas komplexer und bedarf einer nach den jeweils eingesetzten Testsystemen differenzierten Analyse und Diskussion. Probe # 63901 enthielt relativ hohe Mengen an MRSA und ein *mecA*-negatives *S. epidermidis* Isolat. Diese Konstellation konnte zumindest von der Mehrzahl der Teilnehmer mit SCC*mec*-basierten Testkonzepten aufgelöst werden und es wurden insgesamt 68 positive Ergebnisse mitgeteilt.

Wie bereits zuvor erwähnt kann mit der Verwendung von Testsystemen, die auf einer getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen basieren, die Anwesenheit des *mecA* Gens zwar meist nachgewiesen werden, aber dessen Herkunft nicht zweifelsfrei dem Genom der ebenfalls nachgewiesenen *S. aureus* und/oder der Koagulase-negativen Staphylokokkenspezies zugeordnet werden. In diesem Fall wäre "fraglich" das wissenschaftlich korrekte Ergebnis der NAT-gestützten Untersuchung. Unter den 10 als "fraglich" klassifizierten Ergebnissen für Probe # 63901 befinden sich daher auch 4 der insgesamt 6 Teilnehmer mit dem kommerziellen Hyplex StaphyloResist Testsystem sowie 5 Teilnehmer mit eigenentwickelten (*in house*) Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen. Lediglich einer dieser 10 Teilnehmer mit "fraglichem" Ergebnis gibt hier die Verwendung der SCC*mec* basierten Testsystems GenoType MRSA Direct an. Da mit letzterem Testsystem jedoch im Prinzip ein eindeutiger Nachweis von MRSA in komplexen Mischungen aus MRSA und Koagulase-negativen Streptokokken geführt werden kann, handelt es sich hier offensichtlich um ein laborinternes Kontaminationsereignis innerhalb der eingesetzten Verfahren zur Nukleinsäure-Extraktion, Amplifikation oder Detektion.

Überraschenderweise wurden bei dieser Probe auch 4 negative Ergebnisse berichtet. Zwei dieser 4 Teilnehmer gaben die Verwendung des Hyplex StaphyloResist Testsystems und 2 Teilnehmer ein eigenentwickeltes (*in house*) Testkonzept zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen (n=1) bzw. zur Detektion der SCC*mec* Integrationsstelle (n=1) an. Da die Probenkonstellation bei # 63901 mit den angegebenen Testsystemen nur als "fraglich" (bzw. im Fall des SCC*mec* Testsystems als "positiv") befundet werden kann, müssten diese Ergebnisse bei der Erteilung entsprechender Zertifikate eigentlich konsequenterweise als "falsch" bewertet werden. Interessanterweise befanden sich auch 10 Laboratorien im Teilnehmerfeld, die die Verwendung von kommerziellen oder eigenentwickelten Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen angegeben und ein positives Ergebnis für Probe # 63901 mitgeteilt haben. Wie jedoch in diesen 10 Fällen das Ergebnis "MRSA positiv" mit Hilfe der eingesetzten Testkonzepte zustande gekommen ist, ist methodisch eigentlich nicht nachvollziehbar.

Ähnlich gestaltet sich die Situation bei der Probe # 63904 des aktuellen Ringversuchs. Diese enthielt ein *mecA*-negatives *S. aureus* Isolat (MSSA) und gleichzeitig ein *mecA*-positives Isolat von *S. epidermidis*. Bei dieser Probe wurden ebenfalls 10 als "fraglich" klassifizierte Ergebnisse mit identischer Teilnehmerkonstellation zu Probe # 63901 berichtet: 4 Teilnehmer mit dem Hyplex

StaphyloResist Testsystem, 5 Teilnehmer mit eigenentwickelten Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen, sowie ein Teilnehmer mit dem SCC*mec*-basierten Testsystem GenoType MRSA Direct (übrigens der selbe Teilnehmer, der auch schon die Probe # 63901 als "fraglich" klassifiziert hatte). Bei Verwendung der beiden erstgenannten Testkonzepte wäre "fraglich" hier auch das wissenschaftlich korrekte Ergebnis.

Wie in Tabelle 2 dargestellt, fanden sich unter den insgesamt 82 für die Probe # 63904 mitgeteilten Ergebnissen 48 richtig negative aber auch 24 falsch-positive Ergebnisse. Unter diesen 24 Teilnehmern, die diese Probe als MRSA-positiv befundet haben, befanden sich 22 Teilnehmer mit kommerziellen oder eigenentwickelten Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen (n=21) bzw. zur Detektion der SCC*mec* Integrationsstelle (n=1), sowie 2 Teilnehmer mit dem Hyplex StaphyloResist Testsystem. Da die Probenkonstellation bei # 63904 mit den aufgeführten Testsystemen lediglich als "fraglich" (bzw. im Fall des SCC*mec*-basierten Testsystems als "negativ") befundet werden kann, müssten diese Ergebnisse bei der Erteilung entsprechender Zertifikate konsequenterweise als "falsch" bewertet werden. Auch bei dieser Probe befanden sich wieder einige Laboratorien (n=8) im Teilnehmerfeld, die die Verwendung von kommerziellen oder eigenentwickelten Testkonzepten zur getrennten Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen angegeben und als Ergebnis für Probe # 63904 "MRSA negativ" mitgeteilt haben. Wie dieses eindeutige Ergebnis mit Hilfe der eingesetzten Testkonzepte zustande gekommen ist, bleibt rätselhaft.

Bei der statistischen Auswertung in Tabelle 3 bestätigt sich der bereits beim vorhergegangenen Ringversuch zu beobachtende Trend: SCC*mec*-basierte Testkonzepte scheinen für den gezielten Nachweis von MRSA in komplexen Mischungen aus MRSA und Koagulase-negativen Streptokokken einen gewissen Vorteil gegenüber den Testsystemen mit getrennter Erfassung von speziesspezifischen Markern und dem *mecA* Gen zu bieten. Andere, für den Routineeinsatz oftmals aber auch entscheidende Kriterien, wie die untere Nachweisgrenze (analytische Sensitivität) oder die Spezifität, konnten jedoch im Rahmen des aktuellen Ringversuchs nicht abgeprüft werden. Für Kollegen, die an einer umfassenden Abprüfung der *Performance* ihrer neu- oder eigenentwickelten Testsystemen interessiert sind, stehen aber noch vom vorhergegangenen Ringversuch einige fertig konfektionierte Sets an Rückstellproben zur Verfügung, die über den Ringversuchsleiter bezogen werden können.

Optional wird im Rahmen dieser neuen Ringversuchsreihe auch der molekulargenetische Nachweis des putativen Pathogenesefaktors PVL (Panton-Valentine Leukozidin) bzw. dessen codierende Gene *lukF/S* abgefragt. Entsprechende Ergebnisse wurden von 27 der insgesamt 82 teilnehmenden Laboratorien mitgeteilt - und bis auf ein Ergebnis waren diese erfreulicherweise auch 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.

**PCR-/NAT MRSA / cMRSA  
 (RV 539) September 2006**



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

Gruppe A	Erwartet / expected		Probenzusammensetzung / Sample composition
63901	++	61 /72,73,76	MRSA + CoNS ( <i>S. epi.</i> , <i>oxa<sup>S</sup></i> ) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)
63902	∅	62	<i>Escherichia coli</i> K12
63903	++	61 /71,72	MRSA (PVL-pos.) (~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL) MLST:30; spa: t019
63904	∅	62 /72, 73,76	<i>S. aureus</i> + CoNS ( <i>S. epi.</i> , <i>oxa<sup>R</sup></i> )(~ 1x10 <sup>5</sup> CFU/mL)

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

n = 82	Probennummer (Sample no.)				Inhibition			
	63901	63902	63903	63904	63291	63902	63903	63904
<b>Befund</b> <i>Result</i>								
<b>Positiv</b>	68	0	81 <sup>1)</sup>	24	n.d.	1	1	1
<b>Negativ</b>	4	82	1	48	nein <i>no</i>	81	81	81
<b>Fraglich</b> <i>Questionable</i>	10 <sup>2,§</sup>	0	0	10 <sup>2,§</sup>	ja <i>yes</i>	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>	%
<b>In house PCR assay [28] (n = 36)</b>	<b>65</b>	65 / 68 §	<b>96</b>	<b>52</b>	52 / 68 §	<b>77</b>
<b>IDI-MRSA (BD-GeneOhm) [20] (n = 20)</b>	<b>10</b>	10 / 10	<b>100</b>	<b>10</b>	10 / 10	<b>100</b>
<b>GenoType MRSA Direct [21] (n = 22)</b>	<b>43</b>	43 / 43 §	<b>100</b>	<b>43</b>	43 / 43 §	<b>100</b>
<b>Hyplex StaphyloResist [22] (n = 6)</b>	<b>6</b>	6 / 8 §	<b>75</b>	<b>6</b>	6 / 8 §	<b>75</b>
<b>LightCycler Kits [23] (n = 8)</b>	<b>15</b>	15 / 15 §	<b>100</b>	<b>11</b>	11 / 15 §	<b>73</b>
<b>Commercial assay kit [27] (n = 7)</b>	<b>14</b>	14 / 14	<b>100</b>	<b>11</b>	11 / 14	<b>79</b>
<b>Andere / k.A. / other [29] (n = 4)</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>	<b>8</b>	8 / 8	<b>100</b>

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

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

**Comments:** <sup>1)</sup> cMRSA identification was performed by 27 of the 82 participating laboratories. 26 of the 27 PVL (*lukFS*)-PCR results for MRSA samples # 63901 and # 63903 were correct.  
<sup>2)</sup> Depending on the assay concept used, "questionable" may be the correct result.



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 09.2006

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

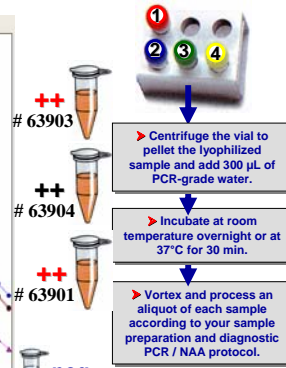
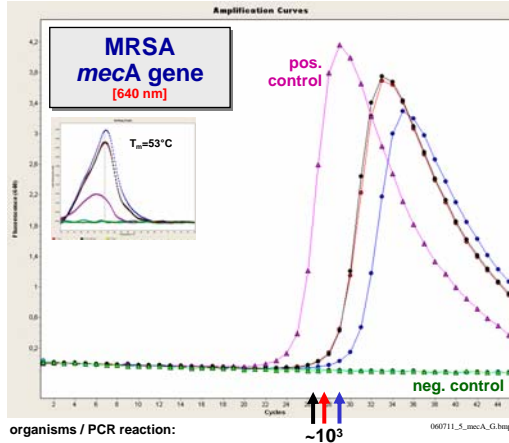
Reischl / Lehn / Wolf

7	RV 63901	28,59
8	RV 63902	
9	RV 63903	26,76
10	RV 63904	26,69
11	Positive mecA	22,75
12	Negative control	



**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.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I 03\_II/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 09.2006

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

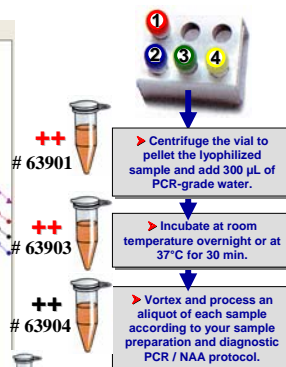
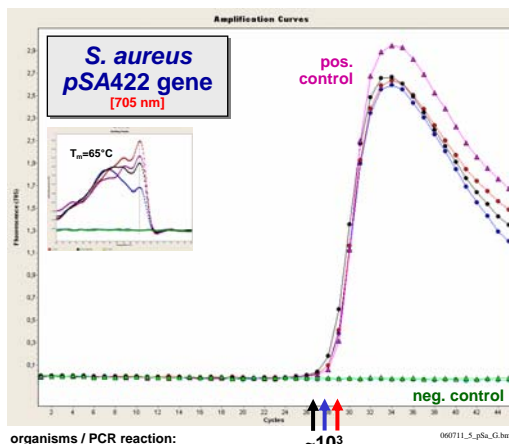
Reischl / Lehn / Wolf

19	RV 63901	26,49
20	RV 63902	
21	RV 63903	26,47
22	RV 63904	26,13
23	Positive pSa	26,62
24	Negative control	



**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.



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I 04\_II/06





## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 09.2006

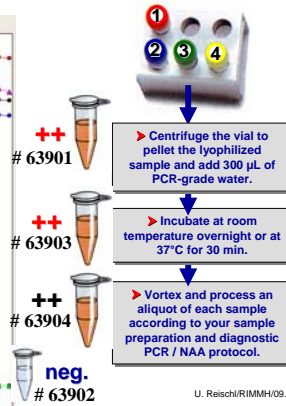
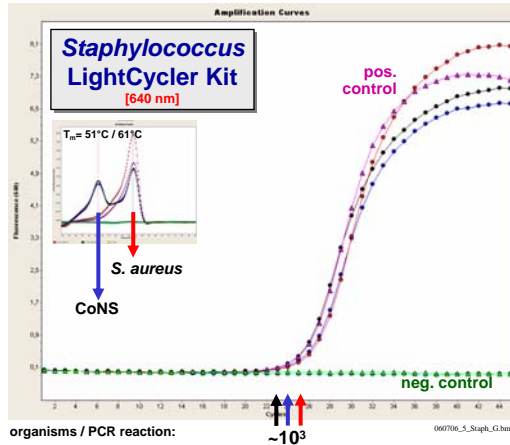
### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

1	FV 63901	25,07
2	FV 63902	
3	FV 63903	25,66
4	FV 63904	24,36
5	Positive Staph.	24,88
6	Negative control	



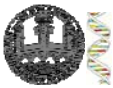
LightCycler PCR protocol:  
 LC Staphylococcus Kit  
 Microbiology  
 (Roche Diagnostics)



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I 05\_II/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 09.2006

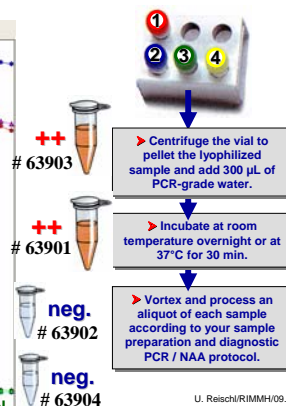
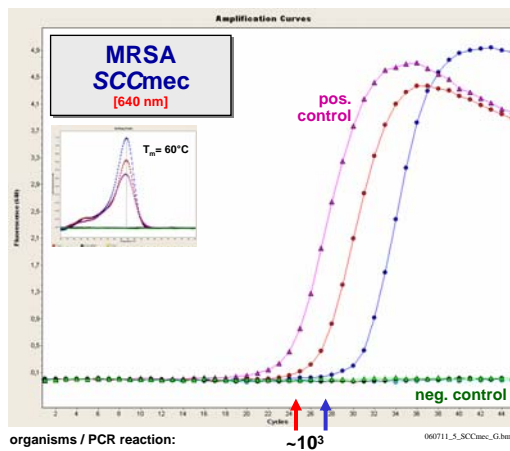
### Evaluation (quantitative Real-Time PCR):

Reischl / Lehn / Wolf

13	FV 63901	29,76
14	FV 63902	
15	FV 63903	25,78
16	FV 63904	
17	Positive SCCmec	23,09
18	Negative control	



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



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I 06\_II/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

status 09.2006

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

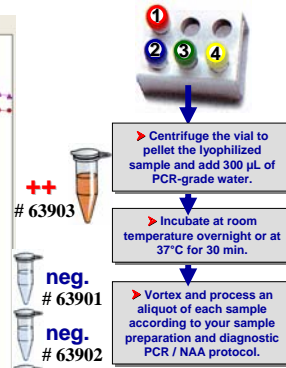
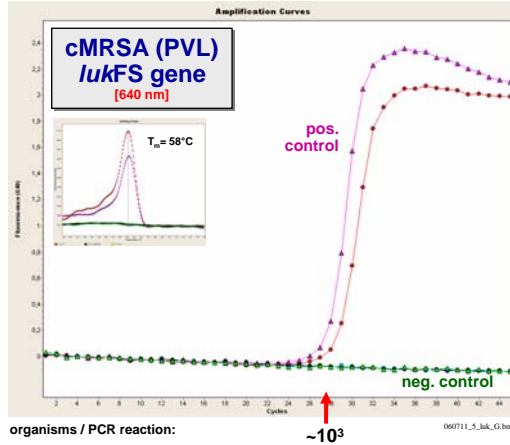
Reischl / Lehn / Wolf

- 1 RV 63901
- 2 RV 63902
- 3 RV 63903
- 4 RV 63904
- 5 Positive *lukFS*
- 6 Negative control

26,65  
25,64



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



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I 07\_II/06

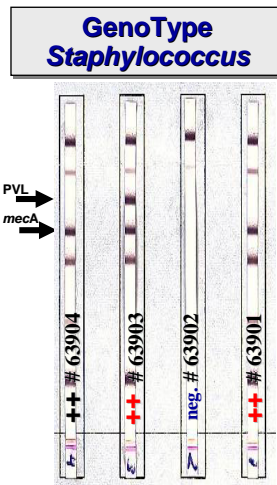


## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

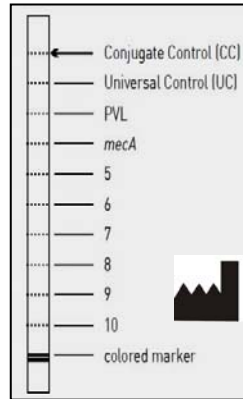
status 09.2006

### Evaluation (commercial PCR assay):

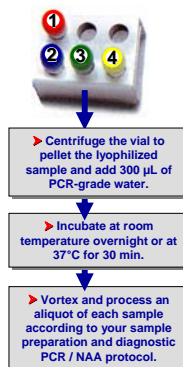
Reischl / Lehn / Wolf



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



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



U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I 08\_II/06



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

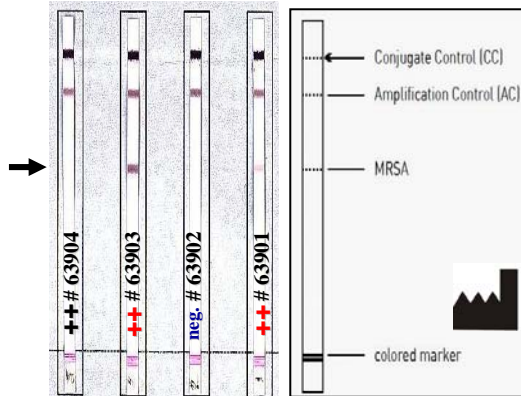
status 09.2006

### Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Lehn / Wolf

#### GenoType MRSA Direct

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



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



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- ▶ Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- ▶ Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I\_09\_II/06

MarbH RV3 MRSA Direct 12.jpg



## 539 Bakteriengenom-Nachweis MRSA

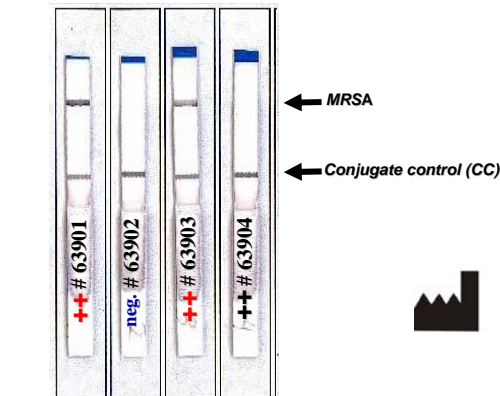
status 09.2006

### Evaluation (commercial PCR assay):

Reischl / Lehn / Wolf

#### GenoQuick MRSA VER 3 2.0

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



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



- ▶ Centrifuge the vial to pellet the lyophilized sample and add 300 µL of PCR-grade water.
- ▶ Incubate at room temperature overnight or at 37°C for 30 min.
- ▶ Vortex and process an aliquot of each sample according to your sample preparation and diagnostic PCR / NAA protocol.

U. Reischl/RIMMH/09.2006



INSTAND-I\_10\_II/06

MarbH RV1 GenoQuick MRSA VER beta 2.jpg