

MutaPLEX[®] MRSA real time PCR kit

Test für den qualitativen in-vitro-Nachweis von methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA)-DNA in klinischen Proben

Test for the qualitative in vitro detection of methicillin resistant staphylococcus aureus (MRSA) DNA in clinical specimens

Gültig ab / Valid from 2017-11-10

REF **KG190332**

Σ 32

REF **KG190396**

Σ 96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

Inhalt

1	VERWENDUNGSZWECK	1
2	EINLEITUNG	1
3	TESTPRINZIP	1
4	INHALT DER TESTPACKUNG	2
5	ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL	2
6	TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	2
7	WICHTIGE HINWEISE	3
8	ALLGEMEINE HINWEISE	3
9	PROBENMATERIAL	3
10	PROBENVORBEREITUNG	4
11	KONTROLL-DNA	4
	<i>DNA-Isolation aus klinischen Proben</i>	<i>4</i>
12	REAL-TIME-PCR	5
	12.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	12.2 <i>Durchführung</i>	5
	12.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	6
13	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	8
14	VALIDIERUNGSDATEN	10
15	EINSCHRÄNKUNGEN	11
16	PROBLEMBEHANDLUNG	11
17	LEISTUNGSDATEN	12
	17.1 <i>Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	12
	17.2 <i>Analytische Sensitivität</i>	13
	17.3 <i>Analytische Spezifität</i>	13
18	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	14
19.	LITERATUR	15

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kit dient dem Nachweis von MRSA-DNA in klinischen Proben mittels Real-time-PCR in offenen Real-time-PCR-Systemen.

2 EINLEITUNG

Staphylococcus aureus sind grampositive Kokken, die in der Umwelt allgegenwärtig sind. 25–30 % der menschlichen Bevölkerung sind dauerhafte *Staphylococcus-aureus*-Träger, da die Bakterien häufig Teil der Haut- und Nasenflora sind. *Staphylococcus aureus* kann ein breites Spektrum von Krankheiten auslösen, darunter kleinere Hautinfektionen (z. B. Furunkel und Abszesse) und Pyomyositis, aber auch lebensbedrohliche Erkrankungen wie Pneumonie, Endokarditis, das toxische Schocksyndrom (TSS) und Sepsis.

Methicillinresistente *Staphylococcus-aureus* (MRSA) -Stämme sind weltweit von wachsender Bedeutung. MRSA stellen insbesondere in Krankenhäusern eine Gefahr dar, da sie gegen alle β -Laktam-Antibiotika (z. B. Penicillin) und oft auch weitere Antibiotika resistent sind.

3 TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden für die Amplifikation von MRSA-DNA in klinischen Proben. Die PCR detektiert die *orfX/SSCmec junction* und weist auch Coagulase-negative Staphylokokken nach. Des Weiteren ermöglicht der MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kit auch den Nachweis des Methicillinresistenzgens *mecA/mecC*, so dass falsch positive Ergebnisse durch Dropout-Mutanten ausgeschlossen werden können.

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der erregerspezifischen Fluoreszenzsonden. Die pathogenspezifische Detektion erfolgt im FAM-Kanal. Die Detektion der *mecA/mecC*-Genenthaltenden Proben erfolgt im Cy5-Kanal. Bei einer Amplifikation in beiden Kanälen ist die Probe MRSA-positiv.

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kit über eine Kontroll-DNA, die während der Extraktion zugefügt und in einem heterologen Amplifikationssystem nachgewiesen wird. Dies ermöglicht zum Einen das Aufdecken von Fehlern bei der DNA-Extraktion, zum Anderen kann eine mögliche Inhibition der PCR identifiziert werden. Dadurch wird das Risiko von falsch negativen Ergebnissen reduziert. Die Detektion der DNA-Extraktionskontrolle erfolgt im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 (KG190396) bzw. 32 (KG190332) Nachweisreaktionen.

Tabelle 1: Inhalt des MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kits

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt	
		32	96
Reaction Mix	gelb	1 x 512 µl	2 x 768 µl
Positive control	rot	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	grün	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control DNA	transparent	1 x 160 µl	2 x 240 µl

5 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z.B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, MutaCLEAN® Plus, KG1036, oder das magnetpartikelbasierte System MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023)
- Reinstwasser*
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel
- optional: Pipettiergeräte zur Automation
- optional: BLP-DNA (bakterienähnliche Partikel, KG7013, siehe Kapitel 11)

* Immundiagnostik AG empfiehlt die Verwendung von Reinstwasser nach ISO 3696. Es handelt sich dabei um Wasser des Typs 1, welches frei von ungelösten und kolloidalen Ionen und organischen Molekülen ist (frei von Partikeln > 0,2 µm) mit einer elektrischen Leitfähigkeit von 0,055 µS/cm bei 25 °C (≥ 18,2 MΩ cm).

6 TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kit erfolgt gefroren auf Trockeneis. Alle Komponenten sind direkt nach Erhalt lichtgeschützt bei -20 °C zu lagern. Nach Ablauf des auf der Packung angegebenen Haltbarkeitsdatums nicht mehr verwenden.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate bei 2–8°C haltbar. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Schützen Sie den Test während der gesamten Testlaufzeit vor direkter Sonneneinstrahlung.

7 WICHTIGE HINWEISE

- Die MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Die Richtlinien der *Good Laboratory Practice* (GLP) sind einzuhalten.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.

8 ALLGEMEINE HINWEISE

- Der Assay ist immer nach der im Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Areale für die Probenvorbereitung und den Ansatz des PCR-Master-Mix sollten strikt getrennt sein.
- Pipetten, Röhrchen und andere Arbeitsmaterialien dürfen nicht von einem Bereich in den anderen zirkulieren.
- Immer Pipettenspitzen mit Filtern verwenden.
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Reagenzien der Testpackung dürfen nicht mit anderen Chargen gemischt werden.

9 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für die Nachweisreaktion ist DNA, die aus klinischen Proben (z. B. Rachen-, Nasen-, Wundabstriche, Bronchiallavagen) isoliert wurde.

10 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR ist geeignet für den Nachweis von MRSA-DNA, die zuvor aus mit Hilfe geeigneter Methoden aus Proben isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur DNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038).

Wichtig: Unabhängig vom verwendeten Probenmaterial sollte zusätzlich zu den Proben eine Wasserkontrolle (Reinstwasser) extrahiert werden, anhand derer sich eventuell auftretende Inhibitionen und Kontaminationen ablesen lassen. Diese Wasserkontrolle muss analog einer Probe behandelt werden.

Beachten Sie bitte auch Kapitel 11 (Kontroll-DNA).

Falls die Real-time-PCR nicht sofort durchgeführt wird, müssen die DNA-Extrakte entsprechend den Angaben des DNA-Extraktionskitherstellers aufbewahrt werden.

11 KONTROLL-DNA

Der MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR enthält eine Kontroll-DNA, die zum einen als DNA-Extraktionskontrolle dient, zum anderen als interne Kontrolle mögliche Inhibitionen der Real-time-PCR aufzeigt.

Die bakterienähnlichen Partikel (*bacterium-like particles*, BLP, KG7013) sind nicht im Kit enthalten.

DNA-Isolation aus klinischen Proben

a) Kontroll-DNA oder BLP-DNA als Extraktionskontrolle

MutaPLEX® MRSA Kontroll-DNA oder BLP-DNA zur DNA-Extraktion geben.

5 µl Kontroll-DNA oder BLP-DNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die DNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch. Setzen Sie anschließend die Real-time-PCR nach Protokoll A an.

Die Kontroll-DNA muss dem Lysepuffer des Extraktionskits zugesetzt werden.

b) Kontroll-DNA als interne Kontrolle der Real-time-PCR

Sollte keine Kontrolle der DNA-Extraktion gewünscht sein, wohl aber eine Kontrolle der PCR, so kann die Kontroll-DNA erst beim Ansetzen der PCR zugegeben werden. In diesem Fall ist die Real-time-PCR nach Protokoll B anzusetzen.

12 REAL-TIME-PCR

12.1 Wichtige Hinweise vor Beginn

- Bitte beachten Sie Kapitel 7 („Wichtige Hinweise“).
- Bevor Sie die PCR ansetzen, machen Sie sich mit dem Real-time-PCR-Gerät vertraut.
- Die Programmierung des Temperaturprofils sollte abgeschlossen sein, bevor die PCR angesetzt wird.
- Beachten Sie, dass in jedem PCR-Lauf mindestens eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle enthalten sein sollte.
- Alle Reagenzien müssen komplett aufgetaut, gemischt und kurz an zentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

12.2 Durchführung

Falls die Kontroll-DNA oder BLP-DNA als echte Extraktionskontrolle verwendet wird, bitte Protokoll A folgen. Wird die Kontroll-DNA lediglich zur Kontrolle einer möglichen Inhibition der Real-time-PCR verwendet, bitte Protokoll B befolgen.

Protokoll A

Die Kontroll-DNA oder BLP-DNA wurde bereits zur DNA-Extraktion zugegeben (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 2 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 2: Herstellung des Master-Mix (Kontroll-DNA wurde während der DNA-Extraktion zugefügt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

Protokoll B

Die Kontroll-DNA wird ausschließlich zur Kontrolle der Real-time-PCR verwendet (siehe Kapitel 11 „Kontroll-DNA“). In diesem Fall wird der Master-Mix gemäß Tabelle 3 angesetzt.

Der Master-Mix enthält alle benötigten Komponenten außer der Probe. Setzen Sie für die Gesamtzahl der geplanten PCR-Ansätze mindestens einen Ansatz mehr als benötigt an.

Tabelle 3: Herstellung des Master-Mix (die Kontroll-DNA wird dem Master-Mix beigemischt)

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)
0,5 µl Control DNA *	0,5 µl x (N+1)*

* Die durch Zugabe der Kontroll-DNA verursachte Volumenerhöhung kann vernachlässigt werden. Die Sensitivität des Nachweissystems ist dadurch nicht beeinträchtigt.

Protokoll A und B: Ansetzen der Real-time-PCR

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen.
- 16 µl des Master-Mix in jedes Gefäß pipettieren.
- 4 µl der DNA-Eluate (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße pipettieren (Tabelle 4).
- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 4: Ansetzen der Real-time-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	16,0 µl
Probe	4,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

12.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-PCR ist das in Tabelle 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 5: Real-time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
cDNA-Amplifikation			45
Denaturierung	10 s	95 °C	
Annealing und Verlängerung	40 s	60 °C Messung am Ende dieses Schrittes	

Abhängig vom verwendeten Real-time-Gerät müssen noch weitere, in Tabelle 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 6: Überblick über die für die MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR benötigten Geräteeinstellungen

Real-time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	FAM (465-510) HEX (533-580) CY5 (618-660)	Colour compensation kit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) not required		
			Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)
			1	10	1
			1	10	2
1	10	3			
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	FAM HEX Cy5	Gain 8 Gain 1 Gain 4	Reference dye: none	
ABI 7500	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	FAM JOE Cy5	Option reference dye ROX: NO		

Real-time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen	
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	Green Yellow Red	Gain 5 Gain 5 Gain 5	

13 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die MRSA-spezifische Amplifikation wird im FAM-Kanal detektiert. Die mecA/mecC-Gen-spezifische Amplifikation wird im Cy5-Kanal gezeigt. Die Amplifikation der Kontroll-DNA wird im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal gemessen.

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Ct-Werte			Interpretation
FAM-Kanal SCCmec	Cy5-Kanal Resistenzgen mecA/mecC	HEX-Kanal	
positiv	positiv	positiv oder negativ	Positives Ergebnis, die Probe enthält MRSA-DNA. Das Ergebnis der Kontroll-DNA ist irrelevant.
positiv	negativ	positiv oder negativ	Negatives Ergebnis, die Probe enthält MS-MRSA-DNA. Das Ergebnis der Kontroll-DNA ist irrelevant.
negativ	positiv	positiv oder negativ	Negatives Ergebnis, die Probe enthält MR-CoNS-DNA. Das Ergebnis der Kontroll-DNA ist irrelevant.
negativ	negativ	27–35*	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder MRSA-, MS-MRSA- noch MR-CoNS-DNA.

Ct-Werte			Interpretation
FAM-Kanal SCCmec	Cy5-Kanal Resistenzgen mecA/mecC	HEX-Kanal	
negativ	negativ	> 35*/ negativ	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die Real-time-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der DNA-Extraktion auf.

* Die Ct-Werte verschieben sich ggf. je nach verwendetem PCR-Gerät und/oder der verwendeten Extraktionsmethode. Die Wasserkontrolle kann als Referenz verwendet werden. Falls der Ct-Wert im HEX-Kanal stark von dem der Wasserkontrolle abweicht, liegt eine teilweise Inhibition vor, die im Falle schwach positiver Proben zu einem falsch negativen Ergebnis führt.

Abbildung 1 und Abbildung 2 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-PCR-Ergebnisse.

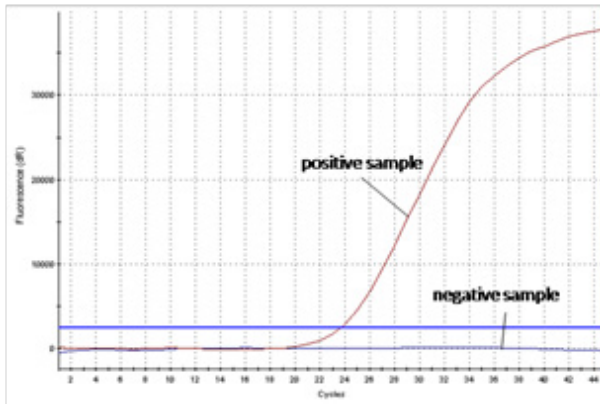


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im pathogenspezifischen FAM-/Cy5-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

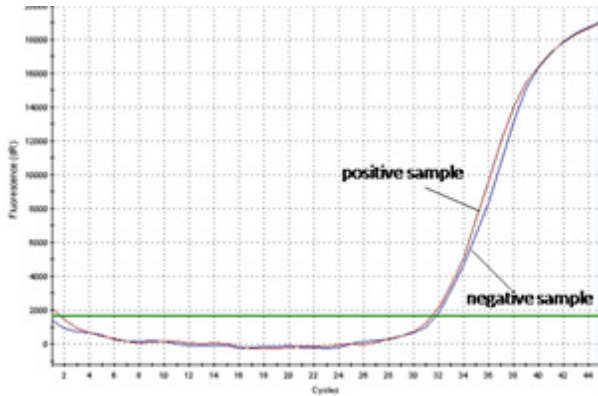


Abb. 2: Im VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-PCR vor, auch verlief die DNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

14 VALIDIERUNGSDATEN

Stellen Sie die Grenzwerte des Real-time-Geräts wie im Folgenden beschrieben ein.

Negativkontrollen

Alle Negativkontrollen sollten unter dem Grenzwert liegen. Im Falle einer möglichen Kontamination (Auftreten einer Kurve in der Negativkontrolle oder einer Anhäufung von Kurven in Proben mit hohem CT, beispielsweise über 36) sind die erhaltenen Ergebnisse nicht interpretierbar und der gesamte Lauf (inklusive der Extraktion) muss wiederholt werden.

Positivkontrollen

Alle Positivkontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Die Positivkontrollen müssen unter einen CT-Wert von 30 fallen.

Interne Kontrollen

Alle internen Kontrollen müssen eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve aufweisen. Der CT-Wert der internen Kontrolle muss unter 33 liegen. Falls der CT-Wert der internen Kontrolle über 34 liegt, deutet dies auf ein DNA-Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, welche die interne Kontrolle inhibieren kann. In letzterem Fall ist das Testergebnis valide. Falls eine Wasserkontrolle durchgeführt wurde, muss der CT-Wert der internen Kontrolle unter 33 liegen.

15 EINSCHRÄNKUNGEN

Die Ergebnisse müssen stets im Kontext der klinischen Symptome betrachtet werden. Therapeutische Entscheidungen sollten unter Berücksichtigung klinischer Daten getroffen werden.

Ein negatives Testergebnis schließt eine MRSA-Infektion nicht aus.

16 PROBLEMBEHANDLUNG

Die folgenden Problembeschreibungen sollen bei eventuell auftretenden Problemen mit der Real-time-PCR behilflich sein. Sollten Sie weitere Fragen, haben wenden Sie sich bitte direkt an Immundiagnostik.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM- oder Cy5-Kanal der Positivkontrolle

Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal

Wählen Sie den FAM-Kanal für die Analyse der MRSA-spezifischen Amplifikation, den Cy5-Kanal für die der *mecA/mecC*-spezifischen Amplifikation und den VIC®/HEX/JOE/TET-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA .

Fehlerhaftes Ansetzen der Real-time-PCR

Überprüfen Sie Ihre Arbeitsschritte und vergleichen Sie diese mit den im Kapitel „Durchführung“ beschriebenen Schritten.

Fehlerhaftes Real-time-PCR-Temperaturprofil

Vergleichen Sie das Temperaturprofil mit dem Protokoll (Tabelle 5).

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Schwaches oder kein Signal der Kontroll-DNA und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im FAM- oder Cy5-Kanal

Die Real-time-PCR-Bedingungen stimmen nicht mit den im Protokoll beschriebenen überein

Überprüfen Sie die Real-time-PCR-Bedingungen (Kapitel 12).

Real-time-PCR-Inhibition

Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode benutzen (siehe Kapitel „Probenvorbereitung“). Beachten Sie die Herstellerangaben. Stellen Sie sicher, dass ethanolhaltige Waschpuffer vollständig entfernt wurden (ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt bei hoher Geschwindigkeit vor der DNA-Elution wird empfohlen).

Verlust der DNA während des Aufarbeitungsprozesses

Falls die Kontroll-DNA vor der Extraktion zugefügt wurde, kann das Ausbleiben des Signals auf eine fehlerhafte DNA-Extraktion hinweisen. Stellen Sie sicher, dass Sie eine geeignete Extraktionsmethode verwenden und beachten Sie die Herstellerangaben.

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kit-etikett. Falls nötig, benutzen Sie einen neuen Kit und lagern Sie alle Komponenten wie im Kapitel „Transport und Lagerung“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM- oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle***Kontamination des Real-time-PCR-Ansatzes***

Wiederholen Sie die Real-time-PCR in Replikaten. Falls das Ergebnis der Wiederholungen negativ sein sollte, so ereignete sich die Kontamination während der Befüllung der Reaktionsgefäße. Stellen Sie sicher, dass Sie die Positivkontrolle zuletzt pipettieren und verschließen Sie die Reaktionsgefäße sofort nachdem Sie die jeweilige Probe zugegeben haben. Falls die Negativkontrolle in der Wiederholung wieder ein Signal im FAM-Kanal ergibt, deutet dies darauf hin, dass eine oder mehrere Kitkomponenten kontaminiert sind. Stellen Sie sicher, dass die Arbeitsbereiche und die Geräte regelmäßig dekontaminiert werden. Wiederholen Sie die Real-time-PCR mit einem neuen Kit.

17 LEISTUNGSDATEN***17.1 Diagnostische Sensitivität und Spezifität***

Während der Validierungsstudie des MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kits wurden 14 positive und 13 negative Proben getestet. Der Wert für sowohl diagnostische Spezifität als auch Sensitivität wurde mit 100 % bestimmt (Tabelle 7).

Sowohl der positive als auch der negative Vorhersagewert liegen bei 100 %.

Tabelle 7: Übersicht über getestete Probenanzahl sowie sich daraus ergebende positive und negative Vorhersagewerte.

	Positive Proben	Negative Proben
MutaPLEX® MRSA positiv	14	0
MutaPLEX® MRSA negativ	0	13
Sensitivität	100 %	
Spezifität	100 %	

17.2 Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität des MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kits wurde anhand serieller Verdünnungsstufen synthetischer Ziel-DNA in einem Stratagene Mx3000 Real-time-PCR-Gerät bestimmt.

Die LoD des MutaPLEX® MRSA Real-time-PCR-Kits beträgt mindestens 1 cfu pro Reaktion.

17.3 Analytische Spezifität





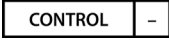



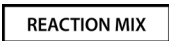





Die Spezifität wurde anhand der in Tabelle 8 gelisteten Viren und Bakterien bestimmt. Die Primer und Sonden detektieren die MRSA-Probe, aber keine anderen Pathogene.

Tabelle 8: Für die Bestimmung der Primer- und Sondenspezifität des MRSA Real-time-PCR-Kits verwendete bakterielle und virale Pathogene

Spezies	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negativ	negativ
Coxsackievirus Strain P.B.	negativ	negativ
Coxsackievirus Strain B.S.	negativ	negativ
<i>Herpes simplex virus</i>	negativ	negativ
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negativ	negativ
Tick borne encephalitis	negativ	negativ
Influenza A	negativ	negativ
Influenza B	negativ	negativ
Respiratory syncytial virus A	negativ	negativ
Respiratory syncytial virus B	negativ	negativ
<i>Legionella pneumophila</i> Serogroup 1	negativ	negativ
Cytomegalovirus	negativ	negativ

Spezies	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
MRSA	positiv	positiv

18 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

DNA	Desoxyribonukleinsäure	BLP	Bakterienähnliche Partikel
CT	Cycle Threshold		Kontroll-DNA
MRSA	Methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i>		Zu verwenden mit
MS-MRSA	Methicillinempfindliche MRSA, mecA Dropout-Mutante	OrfX/SCCmec	Verbindung von <i>S.-aureus</i> -DNA und SCCmec-Kassette
MSSA	Methicillinempfindlicher <i>Staphylococcus aureus</i>	MR-ConS	Methicillinresistenter, Coagulase-negativer <i>Staphylococcus</i>
mecA / mecC	Zwei Varianten des Methicillinresistenzgens		Hersteller
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Katalognummer
	Negativkontrolle		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
	Positivkontrolle		Obere Temperaturgrenze
	Reaktionsmix		Verwendbar bis
	Inhalt		Chargennummer
	Arbeitsanleitung beachten		<i>In-vitro</i> -Diagnostikum

19. LITERATUR

1. Bundesgesundheitsbl 2014, 57, 696–732: Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen.
2. Centers for Disease Control and Prevention: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. www.cdc.gov/mrsa. May 16, 2016.

MutaPLEX® MRSA real time PCR kit

*Test for the qualitative in vitro detection of MRSA DNA
in clinical specimens*

Valid from 2017-11-10

REF **KG190332**

Σ 32

REF **KG190396**

Σ 96



Immundiagnostik AG, Stubenwald-Allee 8a, 64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: + 49 6251 70190-363

e.mail: info@immundiagnostik.com www.immundiagnostik.com

Table of Contents

1	INTENDED USE	18
2	PATHOGEN INFORMATION	18
3	PRINCIPLE OF THE TEST	18
4	PACKAGE CONTENTS	19
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	19
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	19
7	IMPORTANT NOTES	20
8	GENERAL PRECAUTIONS	20
9	SAMPLE MATERIAL	20
10	SAMPLE PREPARATION	20
11	CONTROL DNA	21
	<i>DNA isolation from clinical samples</i>	<i>21</i>
12	REAL TIME PCR	21
	<i>12.1 Important points before starting</i>	<i>21</i>
	<i>12.2 Procedure</i>	<i>22</i>
	<i>12.3 Instrument settings</i>	<i>23</i>
13	DATA ANALYSIS	24
14	ASSAY VALIDATION	26
15	LIMITATIONS OF THE METHOD	27
16	TROUBLESHOOTING	27
17	KIT PERFORMANCE	29
	<i>17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity</i>	<i>29</i>
	<i>17.2 Analytical Sensitivity</i>	<i>29</i>
	<i>17.3 Analytical Specificity</i>	<i>29</i>
18	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	30
19.	LITERATURE	31

1 INTENDED USE

The MutaPLEX® MRSA real time PCR™ is an assay for the detection of MRSA DNA in clinical specimens in open real time PCR machines.

2 PATHOGEN INFORMATION

Staphylococcus aureus are gram-positive coccal bacteria which are ubiquitously found in the environment. About 25–30% of the human population are long-term carriers of *Staphylococcus aureus* because the bacteria are frequently part of the flora found in the nose and on skin. *Staphylococcus aureus* can cause a range of illnesses such as minor skin infections, like furuncles and abscesses, pyomyositis, but also life-threatening diseases such as pneumonia, endocarditis, toxic shock syndrome (TSS), and sepsis.

Of increasing importance worldwide are methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) strains. Especially in hospitals, MRSA present a danger, because they are resistant to all β -lactam antibiotics (e.g. penicillin) and often possess further resistances to other antibiotics.

3 PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® MRSA real time PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of MRSA DNA in clinical specimens. The PCR targets the *orfX/SSCmec* junction and allows for the detection of MRSA in clinical samples, even those containing coagulase-negative *Staphylococci*. Furthermore, MutaPLEX® MRSA real time PCR kit allows the detection of the methicillin resistance gene *mecA/mecC*, to eliminate false positive results through dropout mutants.

The presence of nucleic acid is detected by an increase in fluorescence due to hydrolysis of the probes during amplification. The fluorescence of the pathogen-specific probes is measured in the FAM channel. The fluorescence of the *mecA/mecC* gene-specific probes is measured in the Cy5 channel. For a positive MRSA result, both channels need to show an amplification.

Furthermore, MutaPLEX® MRSA real time PCR kit contains a control DNA, which is added during DNA extraction and detected in the same reaction by a differently labelled probe.

The control DNA allows the detection of PCR inhibition and acts as control for the isolation of the nucleic acid from the clinical specimen. The fluorescence of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 32 (KG190332) or 96 (KG190396) reactions, respectively.

Table 1: Components of the MutaPLEX® MRSA real time PCR kit.

Label	Lid Colour	Content	
		32	96
Reaction Mix	yellow	1 x 512 µl	2 x 768 µl
Positive control	red	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Negative control	green	1 x 50 µl	1 x 100 µl
Control DNA	colourless	1 x 160 µl	2 x 240 µl

5 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, MutaCLEAN® Plus lysis buffer, KG1036, or the magnet particle based system MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- Sterile pipet tips with filter
- Table centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- Optical PCR reaction tubes with lid
- Optional: Liquid handling system for automation
- Optional: BLP-DNA (bacterium-like particles, KG7013, see chapter 11)

* Immundiagnostik AG recommends the use of Ultra Pure Water (Water Type 1; ISO 3696), which is free of undissolved and colloidal ions and organic molecules (free of particles > 0.2 µm) with an electrical conductivity of 0.055 µS/cm at 25 °C (≥ 18.2 MΩ cm).

6 TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® MRSA real time PCR-Kit is shipped on dry ice. All components must be stored at maximum -20 °C in the dark immediately after receipt. Do not use reagents after the date of expiry printed on the package.

Up to 20 freeze and thaw cycles are possible.

For convenience, opened reagents can be stored at 2–8 °C for up to 6 months.

Protect kit components from direct sunlight during the complete test run.

7 IMPORTANT NOTES

- The MutaPLEX® MRSA real time PCR must be performed by qualified personnel only.
- Good Laboratory Practice (GLP) has to be applied.
- Clinical samples must always be regarded as potentially infectious material and all equipment used has to be treated as potentially contaminated.

8 GENERAL PRECAUTIONS

- Stick to the protocol described in the instructions for use.
- Set up different laboratory areas for the preparation of samples and for the set up of the PCR in order to avoid contaminations.
- Pipettes, tubes and other materials must not circulate between those different laboratory areas.
- Always use filter tips.
- Regularly decontaminate equipment and benches with ethanol-free decontaminant.
- Do not combine MutaPLEX® MRSA real time PCR-Kit components of different lot numbers.

9 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® MRSA real time PCR is bacterial DNA isolated or released from clinical specimens (e.g. throat swabs, nasal swabs, bronchial lavage, wound swabs).

10 SAMPLE PREPARATION

The MutaPLEX® MRSA real time PCR is suitable for the detection of MRSA DNA isolated from clinical specimens with appropriate isolation methods.

Commercial kits for DNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) are recommended.

Important: In addition to the samples, always run a water control in your extraction. Treat this water control analogous to a sample.

Comparing the amplification of the control DNA in the samples to the amplification of the internal control in the water control will give insights on possible inhibitions of the real time PCR. Furthermore, possible contaminations during DNA extraction will be detectable.

Please note chapter 11 “Control DNA”.

If the real time PCR is not performed immediately, store extracted DNA according to the instructions given by the DNA extraction kit’s manufacturer.

11 CONTROL DNA

A control DNA is supplied and can be used as extraction control or only as inhibition control. This allows the user to control the DNA isolation procedure and to check for possible real time PCR inhibition.

The bacterium-like particles (BLP-DNA, KG7013) are not supplied.

DNA isolation from clinical samples

a) Control DNA or BLP-DNA used as extraction control

MutaPLEX® MRSA control DNA or BLP-DNA is added to the DNA extraction.

Add 5 µl control DNA or BLP-DNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the DNA isolation according to the manufacturer’s instructions. Please follow protocol A.

The control DNA must be added to the lysis buffer of the extraction kit.

b) Control DNA used as internal control of the real time PCR

If only inhibition will be checked, please follow protocol B.

12 REAL TIME PCR

12.1 Important points before starting

- Please pay attention to chapter 7 “Important Notes”.
- Before setting up the real time PCR familiarise yourself with the real time PCR instrument and read the user manual supplied with the instrument.
- The programming of the thermal profile should take place before the PCR set up.
- In every PCR run, one positive control and one negative control should be included.

- Before each use, all reagents should be thawed completely at room temperature, thoroughly mixed, and centrifuged very briefly.
- We recommend to keep reagents and samples at 2–8°C (e.g. on ice or a cooling block) at all times.

12.2 Procedure

If the control DNA or BLP-DNA is used to control both, the real time PCR and the DNA isolation procedure, please follow protocol A. If the control DNA is solely used to detect possible inhibition of the real time PCR, please follow protocol B.

Protocol A

The control DNA or BLP-DNA was added during DNA extraction (see chapter 11 “Control DNA”). In this case, prepare the master mix according to table 2.

The master mix contains all of the components needed for PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 2: Preparation of the master mix (control DNA was added during DNA extraction)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)

Protocol B

The control DNA is used for the control of the real time PCR only (see chapter 11 “Control DNA”). In this case, prepare the master mix according to table 3.

The master mix contains all of the components needed for real PCR except the sample. Prepare a volume of master mix for at least one sample more than required, in order to compensate for pipetting inaccuracy.

Table 3: Preparation of the master mix (control DNA is added directly to the master mix)

Volume per reaction	Volume master mix
16 µl Reaction Mix	16 µl x (N+1)
0.5 µl Control DNA *	0.5 µl x (N+1)*

*The increase in volume caused by adding the control DNA is not taken into account when preparing the PCR assay. The sensitivity of the detection system is not impaired.

Protocol A and B: real time PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument.

- Pipet 16 µl of the master mix into each optical PCR reaction tube.
- Add 4 µl of the eluates from the DNA isolation (including the eluate of the water control), the positive control and the negative control to the corresponding optical PCR reaction tube (table 4).
- Close the optical PCR reaction tubes immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

Table 4: Preparation of the real time PCR

Component	Volume
Master mix	16.0 µl
Sample	4.0 µl
Total volume	20.0 µl

12.3 Instrument settings

For the real time PCR use the thermal profile shown in table 5.

Table 5: real time PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
Reverse transcription	10 min	45 °C	1
Initial Denaturation	5 min	95 °C	1
Amplification of DNA			45
Denaturation	10 s	95 °C	
Annealing and extension	40 s	60 °C	
	Aquisition at the end of this step		

Dependent on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 6.

Table 6: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® MRSA real time PCR.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes		
LightCycler 480II	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	FAM (465-510) HEX (533-580) CY5 (618-660)	Colour compensation kit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) not required		
			Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)
			1	10	1
			1	10	2
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	FAM HEX Cy5	Gain 8	Reference dye: none	
			Gain 1		
			Gain 4		
ABI 7500	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	FAM JOE Cy5	Option reference dye ROX: NO		
Rotor-Gene Q, Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	MRSA SCCmec Control DNA mecA/mecC Mutation/ Deletion	Green Yellow Red	Gain 5		
			Gain 5		
			Gain 5		

13 DATA ANALYSIS

The MRSA-specific amplification is measured in the FAM channel. The fluorescence of the mecA/mecC-Gene specific probes is measured in the Cy5 channel. The amplification of the control DNA is measured in the VIC®/HEX/JOE/TET channel.

The following results can occur:

Ct values			Interpretation
FAM channel SCCmec	Cy5 channel resistance gene mecA/mecC	HEX channel	
pos	pos	pos or neg	Positive result, the sample contains MRSA DNA. The result for the control DNA is irrelevant.
pos	neg	pos or neg	Negative result, the sample contains MS-MRSA DNA. The result for the control DNA is irrelevant.
neg	pos	pos or neg	Negative result, the sample contains MR-CoNS DNA. The result for the control DNA is irrelevant.
neg	neg	27-35*	Negative result, the sample contains no MRSA/MS-MRSA and MR-CoNS DNA.
neg	neg	> 35*/ neg	No diagnostic statement can be made. The real time PCR is either inhibited or errors occurred while DNA extraction.

*Depending on the PCR instrument and/or the chosen extraction method, the Ct values might be shifted. The water control can be used as reference. If the HEX Ct value of a sample differs a lot from the water control, partial inhibition has occurred, leading to false negative results in case of weak positive samples.

Figure 1 and figure 2 show examples for positive and negative real time PCR results.

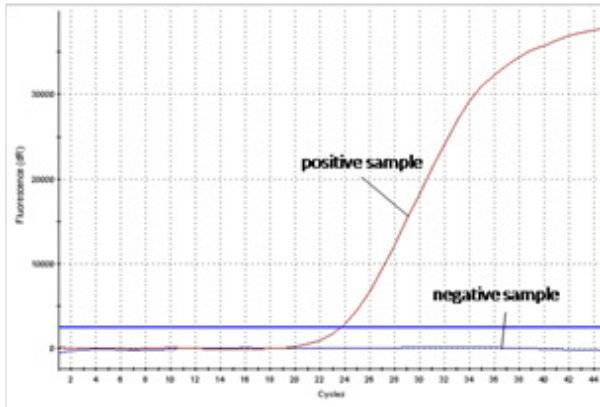


Figure 1: The positive sample shows amplification signal in the bacteria specific channel (FAM/Cy5), whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

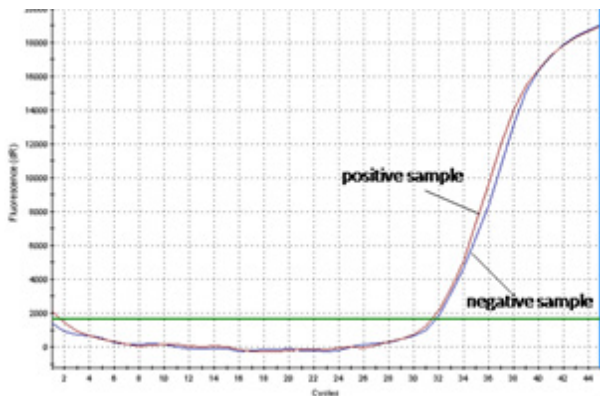


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control DNA-specific VIC®/HEX/JOE/TET channel. The amplification signal of the control DNA in the negative sample shows that the missing signal in the MRSA-specific FAM channel is not due to PCR inhibition or failure of DNA isolation, but that the sample is a true negative.

14 ASSAY VALIDATION

Set a threshold as follows:

Negative controls

All negative controls should be below the threshold. If there is a potential contamination (appearance of a curve in the negative control or a cluster of curves in speci-

mens at high CT – for example above 36), results obtained are not interpretable and the whole run (including extraction) has to be repeated.

Positive controls

All the positive controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The positive controls must fall below a CT of 30.

Internal controls

All internal controls must show a positive (i. e. exponential) amplification curve. The internal control must fall below a CT of 33. If the internal control is above CT 34, this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IC. In the latter case, the assay is valid. If a water control run is performed, the IC must fall below a CT of 33.

15 LIMITATIONS OF THE METHOD

The results must always be considered in relation to the clinical symptoms. Therapeutical consequences should be made in consideration of clinical data.

A negative test result does not exclude a MRSA infection.

16 TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time PCR.

No fluorescence signal in the FAM or Cy5 channel of the positive control

The selected channel for analysis does not comply with the protocol

Select the FAM channel for analysis of the MRSA-specific amplification, the Cy5 channel for the *mecA/mecC*-specific amplification and the VIC®/HEX/JOE/TET channel for the amplification of the control DNA .

Incorrect configuration of the real time PCR

Check your work steps and compare with chapter “Procedure”.

The programming of the thermal profile is incorrect

Compare the thermal profile with the protocol (table 5).

Incorrect storage conditions for one or more kit components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

Weak or no signal of the control DNA and simultaneous absence of a signal in the MRSA-specific FAM or Cy5 channel***real time PCR conditions do not comply with the protocol***

Check the real time PCR conditions (chapter 12).

real time PCR inhibited

Make sure that you use an appropriate isolation method (see “Sample preparation”) and follow the manufacturer’s instructions. Make sure that the ethanol-containing washing buffer of the isolation kit has been completely removed. An additional centrifugation step at high speed is recommended before elution of the DNA.

DNA loss during isolation process

In case the control DNA was added before extraction, the lack of an amplification signal can indicate that the DNA isolation was not successful. Make sure that you use an appropriate isolation method (commercial kits are recommended) and stick to the manufacturer’s protocol.

Incorrect storage conditions for one or more components or kit expired

Check the storage conditions and the date of expiry printed on the kit label. If necessary, use a new kit and make sure kit components are stored as described in chapter “Transport, Storage and Stability”.

Detection of a fluorescence signal in the FAM or Cy5 channel of the negative control***Contamination during preparation of the PCR***

Repeat the real time PCR in replicates. If the result is negative in the repetition, the contamination occurred when the samples were pipetted into the optical PCR reaction tubes. Make sure to pipet the positive control last and close the optical PCR reaction tube immediately after adding the sample. If the same result occurs, one or more of the kit components might be contaminated. Make sure that work space and instruments are decontaminated regularly. Use a new kit and repeat the real time PCR.

17 KIT PERFORMANCE

17.1 Diagnostic Sensitivity and Specificity

During the validation study of the MutaPLEX® MRSA real time PCR kit, 14 positive and 13 negative samples were tested. The diagnostic sensitivity was found to be 100% and the diagnostic specificity 100% (table 7).

The positive predictive value was found to be 100%, the negative predictive value showed to be 100%.

Table 7: Overview of the amount of samples tested and the resulting positive and negative predictive values

	positive samples	negative samples
MutaPLEX® MRSA positive	14	0
MutaPLEX® MRSA negative	0	13
Sensitivity	100%	
Specificity	100%	

17.2 Analytical Sensitivity

The limit of detection (LoD) of MutaPLEX® MRSA real time PCR kit was determined using serial dilutions of synthetic target DNA sequences in a Stratagene Mx3000 real time PCR instrument. The LoD of MutaPLEX® MRSA real time PCR kit is at least 1 cfu per reaction each.

17.3 Analytical Specificity

The specificity of the MutaPLEX® MRSA real time PCR kit was evaluated additionally with different other relevant viruses and bacteria found in clinical samples (table 8).

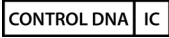





The primers and probes detected the MRSA sample but not any other pathogen tested.



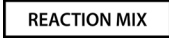





Table 8: Bacterial and viral pathogens used for the determination of the specificity of primers and probes of the MutaPLEX® MRSA real time PCR kit.

Strain	Expected result	Result
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negative	negative
<i>Coxsackievirus</i> Strain P.B.	negative	negative
<i>Coxsackievirus</i> Strain B.S.	negative	negative
<i>Herpes simplex virus</i>	negative	negative

Strain	Expected result	Result
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negative	negative
Tick borne encephalitis	negative	negative
Influenza A	negative	negative
Influenza B	negative	negative
Respiratory syncytial virus A	negative	negative
Respiratory syncytial virus B	negative	negative
<i>Legionella pneumophila</i> serogroup 1	negative	negative
Cytomegalovirus	negative	negative
MRSA	positive	positive

18 ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

DNA	Deoxyribonucleid Acid	BLP	Bacterium-Like Particles
CT	Cycle threshold		Control DNA
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>		To be used with
MS-MRSA	Methicillin-suceptible MRSA, <i>mecA</i> dropout mutant	OrfX/SCCmec	Junction for <i>S. aureus</i> DNA and SCCmec cassette
MSSA	Methicillin-suceptible <i>Staphylococcus aureus</i>	MR-ConS	Methicillin-resistant coagulase negative <i>Staphylococcus</i>
<i>mecA</i> / <i>mecC</i>	Two variants of the methicillin resistance gene		Manufacturer
PCR	Polymerase Chain Reaction		Catalog number
	Negative control		Contains sufficient for <n> test

	Positive control		Upper limit of temperature
	Reaction Mix		Use by
	Content		Lot number
	Consult instructions for use		In vitro diagnostic medical device

19. LITERATURE

1. Bundesgesundheitsbl 2014, 57, 696–732: Empfehlungen zur Prävention und Kontrolle von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus-Stämmen (MRSA) in medizinischen und pflegerischen Einrichtungen.
2. Centers for Disease Control and Prevention: Methicillin-resistant Staphylococcus aureus. www.cdc.gov/mrsa. May 16, 2016.

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

