

MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit

*Test für den qualitativen In-vitro-Nachweis von
Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus (MRSA)-
DNA und zur Differenzierung von community-acquired
(CA) und hospital-acquired (HA) MRSA*

*Test for the qualitative in vitro detection of
methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) DNA
and the differentiation of community-acquired (CA) and
hospital-acquired (HA) MRSA*

Gültig ab / Valid from 2025-04-08

REF KG190596



IVD



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	4
2. EINLEITUNG	4
3. TESTPRINZIP	5
4. INHALT DER TESTPACKUNG	5
5. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)	6
6. TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT	6
7. WICHTIGE HINWEISE	7
8. PROBENMATERIAL	8
9. PROBENVORBEREITUNG	8
10. KONTROLL-DNA	8
11. REAL-TIME-PCR	9
11.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	9
11.2 <i>Durchführung</i>	9
11.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	10
12. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	12
13. VALIDIERUNGSDATEN	14
14. EINSCHRÄNKUNGEN DER METHODE	14
15. PROBLEMBEHANDLUNG	15
16. LEISTUNGSDATEN	16
16.1 <i>Analytische Sensitivität</i>	16
16.2 <i>Analytische Spezifität</i>	17
16.3 <i>Linearität</i>	19
16.4 <i>Präzision</i>	20
16.5 <i>Diagnostische Sensitivität</i>	21
17. ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	22
18. LITERATUR	23

1. VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time-PCR Kit ist eine Multiplex-Real-Time-PCR für den qualitativen Nachweis und die Differenzierung von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) und die Differenzierung von in der Gemeinschaft erworbenem (CA) und im Krankenhaus erworbenem (HA) MRSA in Eluatn aus biologischen Proben bestimmt. Dieser Test ist ein *In-vitro*-Diagnostikum und für die Verwendung durch professionelles Fachpersonal in Laborumgebung bestimmt. Er kann manuell unter Verwendung offener Real-Time PCR-Systeme durchgeführt werden. Der Assay dient als Hilfsmittel für die Diagnose, das Screening und die Überwachung von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA).

2. EINLEITUNG

Staphylococcus aureus sind gram-positive Kokkenbakterien, die in der Umwelt allgegenwärtig sind. Etwa 25-30 % der menschlichen Bevölkerung sind Langzeiträger von *S. aureus*, da die Bakterien häufig Teil der Hautflora sind und somit in der Nase und auf der Haut zu finden sind. *S. aureus* kann eine Reihe von Krankheiten verursachen, z. B. kleinere Hautinfektionen, wie Furunkel und Abszesse, Pyomyositis, aber auch lebensbedrohliche Krankheiten wie Lungenentzündung, Endokarditis, toxisches Schocksyndrom (TSS) und Sepsis.

Weltweit von zunehmender Bedeutung sind Methicillin-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA)-Stämme. Vor allem in Krankenhäusern stellen MRSA eine Gefahr dar, denn sie sind resistent gegen alle β -Lactam-Antibiotika (z. B. Penicillin) und tragen oft weitere Resistenzen gegen andere Antibiotika. MRSA ist die weltweit führende Ursache für nosokomiale Infektionen (im Krankenhaus erworbene MRSA, auch HA-MRSA genannt). Neben HA-MRSA-Infektionen, kommen auch ambulant erworbene MRSA-Infektionen (CA-MRSA) vor, die außerhalb des dem Krankenhaus erworben werden. In den letzten Jahren wurden auch MRSA-Infektionen im Zusammenhang mit Nutztieren (livestock-associated MRSA oder LA-MRSA) aufgetreten, insbesondere bei Schweinehaltern.

Seit Mitte der 1990er Jahre steigt die Zahl der Infektionen in der Bevölkerung ohne vorherigen Kontakt zu medizinischen Einrichtungen. Diese Zunahme der Infektionen in der Bevölkerung wird durch *Staphylococcus aureus*-Stämme verursacht, die den Virulenzfaktor Panton-Valentine Leukocidin tragen. Die Infektionen treten in der Regel bei gesunden jüngeren Menschen auf. PVL kann sowohl von Methicillin-empfindlichen MSSA als auch von MRSA gebildet werden. MRSA-Stämme, die den Virulenzfaktor PVL tragen, werden als CA-MRSA bezeichnet. Panton-Valentine-Leukocidin (PVL) ist ein Zweikomponenten-Zytotoxin, das Poren bildet. Das Zytotoxin von PVL lysiert Makrophagen sowie neutrophile Granulozyten und trägt zur Gewebsnekrose bei. Die klinische Manifestation von PVL-positiven *Staphylococcus aureus*-Stämmen

sind Haut- und Weichteilinfektionen, insbesondere rezidivierende invasive Abszesse. Selten entwickelt sich eine nekrotisierende Pneumonie mit einer Sterblichkeitsrate von bis zu 75 %. Risikogruppen für die Übertragung von CA-MRSA oder PVL-MSSA sind z. B. Familien, Personen, die enge Kontaktsportarten ausüben, Personen aus Bildungseinrichtungen, Gefangene und Militärangehörige.

3. TESTPRINZIP

Der MutaPLEX® PVL-MRSA Real-time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und doppelt markierte Sonden für die Amplifikation und den Nachweis von MRSA-DNA in biologischen 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. Zusätzlich wird das PVL-Gen nachgewiesen.

Die Detektion der Amplifikation erfolgt in Echtzeit durch die Hybridisierung und anschließende Hydrolyse der erregerspezifischen Fluoreszenzsonden. Die Fluoreszenz der pathogenspezifischen *SSCmec/orfX*-Sonden wird im FAM-Kanal gemessen. Die Fluoreszenz der *mecA/mecC*-Gen-spezifischen Sonden wird im Cy5-Kanal gemessen. Für ein positives MRSA-Ergebnis müssen beide Kanäle eine Amplifikation zeigen. Die Fluoreszenz der PVL-spezifischen Sonden wird im ROX-Kanal gemessen.

Zusätzlich verfügt der MutaPLEX® PVL-MRSA Real-time-PCR-Kit über eine Kontroll-DNA (interne Prozesskontrolle, IPC), die während der DNA-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 HEX-Kanal.

4. INHALT DER TESTPACKUNG

Die mitgelieferten Komponenten sind ausreichend für den Ansatz von 96 Nachweisreaktionen.

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

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt
Reaction Mix	gelb	1 x 1344 µl
Positive control	rot	1 x 150 µl
Negative control	grün	1 x 150 µl
Control DNA	transparent	1 x 480 µl

5. BENÖTIGTE MATERIALIEN (IM KIT NICHT ENTHALTEN)

- DNA-Extraktionskit (z.B. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038, oder das magnetpartikelbasierte System MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023)
- DNase/RNase-freie optische PCR-Gefäße mit Deckel oder optische 96-Well-Platte mit optischer Folie
- Sterile Reaktionsgefäße
- Kalibrierte Präzisionspipetten mit variablen Volumina von 2 - 1000 µl
- Sterile Einwegpipettenspitzen mit Aerosolbarriere
- (Tisch-)Zentrifuge (ohne spezifische Anforderungen)
- Vortex-Wirbelmischer (ohne spezifische Anforderungen)
- Wasser, PCR-Qualität
- Real-time PCR-Gerät mit 4 Farbkanälen (grün, gelb, orange, rot)
- Bei Verwendung eines Roche LightCycler® 480 II-Geräts ist das Farbkompensationskit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) erforderlich.
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

6. TRANSPORT, LAGERUNG UND STABILITÄT

Der Transport des MutaPLEX® PVL-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. Bis zu 20 Frier-Tau-Zyklen sind möglich.

Nach Anbruch der Reagenzien sind diese für maximal sechs Monate bei 2–8°C haltbar.

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

7. WICHTIGE HINWEISE

- Lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie das Produkt verwenden.
- Überprüfen Sie das Produkt und seine Bestandteile vor dem ersten Gebrauch auf Vollständigkeit
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf Personal beschränkt, das speziell in den Techniken der real-time-PCR geschult ist.
- Proben sollten immer als infektiös und/oder biologisch gefährlich in Übereinstimmung mit sicheren Laborpraktiken behandelt werden.
- Eine mikrobielle und Nuklease-Kontamination (DNase/RNase) der Eluate und der Komponenten des Kits ist unbedingt zu vermeiden.
- Verwenden Sie stets DNase/RNase-freie Einwegpipettenspitzen mit Aerosolbarrieren.
- Tragen Sie bei der Handhabung der Kitkomponenten stets puderfreie Einweghandschuhe
- Verwenden Sie getrennte Arbeitsbereiche für (1) die Probenvorbereitung, (2) Reaktionsaufbau und (3) Amplifikations-/Detektionsaktivitäten. Der Arbeitsablauf im Labor sollte unidirektional ablaufen. Tragen Sie immer Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten.
- Ordnen Sie Material und Ausrüstung den einzelnen Arbeitsbereichen zu und transportieren Sie sie nicht von einem Bereich zu einem anderen.
- Lagern Sie positives und/oder potenziell positives Material getrennt von allen anderen Komponenten des Kits.
- Öffnen Sie die Reaktionsgefäße/Platten nicht nach der Amplifikation, um eine Kontamination mit Amplikonen zu vermeiden.
- Zusätzliche Kontrollen können gemäß den Richtlinien oder Anforderungen von örtlicher, staatlicher und/oder bundesstaatlicher Vorschriften oder akkreditierter Organisationen getestet werden.
- Die Reaktionsgefäße dürfen nach der PCR nicht autoklaviert werden, da die amplifizierte Nukleinsäure dadurch nicht abgebaut wird und die Gefahr einer Kontamination des Laborbereichs besteht.
- Entsorgen Sie Proben- und Testabfälle gemäß den örtlichen Sicherheitsvorschriften.
- Mischen Sie keine Komponenten aus verschiedenen Lots.

8. PROBENMATERIAL

Ausgangsmaterial für den MutaPLEX® PVL-MRSA real-time PCR Kit ist aus biologischen Proben isolierte DNA. Aufgrund der Merkmale der Erreger wird in der Regel Probenmaterial wie Nasenabstriche oder Hautabstriche verwendet.

9. PROBENVORBEREITUNG

Gereinigte DNA eignet sich für das Downstream-Processing in der Real-Time-PCR. Für die Extraktion und Aufreinigung von DNA aus verschiedenen biologischen Materialien werden kommerzielle Kits zur DNA-Isolierung wie MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) oder das Magnetpartikel-basierte System MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023) empfohlen. Der Anwender muss die Eignung des jeweiligen DNA-Extraktionskits beurteilen.

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 10 (Kontroll-DNA).

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

10. KONTROLL-DNA

Eine Kontroll-DNA (interne Prozesskontrolle, IPC) wird als Extraktionskontrolle mitgeliefert. Dies ermöglicht dem Benutzer die Kontrolle des DNA-Isolierungsverfahrens und die Überprüfung einer möglichen real-time-PCR-Inhibition.

5 µl Kontroll-DNA zu jeder Extraktion zugeben (5 µl x (N+1)), gut mischen. Führen Sie die DNA-Isolation gemäß der Anleitung des Herstellers durch.

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

11. REAL-TIME-PCR

11.1 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 anzentrifugiert werden.
- Wir empfehlen, die Reagenzien stets in einem Kühlblock (+2 bis +8 °C) oder auf Eis zu kühlen.

11.2 Durchführung

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

Reaktionsvolumen	Master-Mix-Volumen
14 µl Reaction Mix	14 µl x (N+1)

Ansetzen der Real-time-PCR

- Setzen Sie die benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den entsprechenden Halter des Real-Time PCR-Geräts. / Nehmen Sie eine optische PCR-Reaktionsplatte.
- Pipettieren Sie **14 µl** des Master-Mixes in jedes optische PCR-Reaktionsgefäß / die Vertiefungen der optischen 96-Well-PCR-Platte.
- Geben Sie **6 µl** der Eluate aus der RNA-Isolierung (einschließlich des Eluats der Wasserkontrolle), der Positivkontrolle und der Negativkontrolle in das entsprechende optische PCR-Reaktionsgefäß / die Vertiefungen der optischen 96-Well-PCR-Platte (Tabelle 3).

- Die Reaktionsgefäße sofort nachdem die Probe zugefügt wurde verschließen, um das Kontaminationsrisiko zu minimieren.

Tabelle 3: Ansetzen der Real-time-PCR

Komponente	Volumen
Master-Mix	14,0 µl
Probe	6,0 µl
Gesamtvolumen	20,0 µl

11.3 Geräteeinstellungen

Für die Real-time-PCR ist das in Tabelle 4 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 4: Real-time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
Reverse Transkription	10 min	45 °C	1
Initiale Denaturierung	5 min	95 °C	1
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 5 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

Tabelle 5: Überblick über die für die MutaPLEX® PVL-MRSA Real-time-PCR benötigten Geräteeinstellungen.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes			
LightCycler 480II	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	FAM (465-510) HEX (533-580) ROX (533-610) CY5 (618-660)	Colour Compensation kit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) benötigt			
			Melt factor	Quant factor	Maxintegration time (s)	
			1	10	1	
			1	10	2	
			1	10	2	
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P Aria MX	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	FAM HEX ROX Cy5	Gain 8	Reference dye: none		
			Gain 1			
			Gain 1			
			Gain 4			
ABI 7500 QuantStudio 5 CFX 96 CFX Opus 96	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	FAM HEX ROX Cy5	Option reference dye ROX: NO			
			Rotor-Gene Q Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	Green Yellow Orange Red	Gain 5
						Gain 5
						Gain 5
Mic Q-PCR cycler	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	Green Yellow Orange Red	Gain 8			
			Gain 10			
			Gain 10			
			Gain 10			

12. INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Die folgenden Ergebnisse können auftreten:

FAM SCCmec/ orfX	ROX PVL	Cy5 mecA/ mecC	HEX Control DNA	MRSA	Interpretation
+	+	+	positiv oder negativ*	positiv	Community-acquired MRSA (CA-MRSA. PVL-positive). Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
+	-	+	positiv oder negativ*	positiv	Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA. PVL-negative). Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
+	+	-	positiv oder negativ*	negativ	MSSA (methicillin sensitive). Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
+	-	-	positiv oder negativ*	negativ	MSSA. Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
-	+	+	positiv oder negativ*	negativ	CA-MSSA und MR-ConS. Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
-	+	-	positiv oder negativ*	negativ	CA-MSSA. Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
-	-	+	positiv oder negativ*	negativ	MR-ConS. Das Ergebnis für die Kontroll-DNA ist irrelevant.
-	-	-	≤ 34**	negativ	MRSA negativ.
-	-	-	> 34**/ negativ	?	Nicht interpretierbar.

* Ein starkes positives Signal im FAM- und/oder ROX- und/oder Cy5-Kanal kann die Kontroll-DNA inhibieren. In solchen Fällen kann das Ergebnis für die Kontroll-DNA vernachlässigt werden.

** Bei hohen C_T -Werten sollte die IPC mit der Wasserextraktionskontrolle verglichen werden, wie im Kapitel „Validierungsdaten“ beschrieben.

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

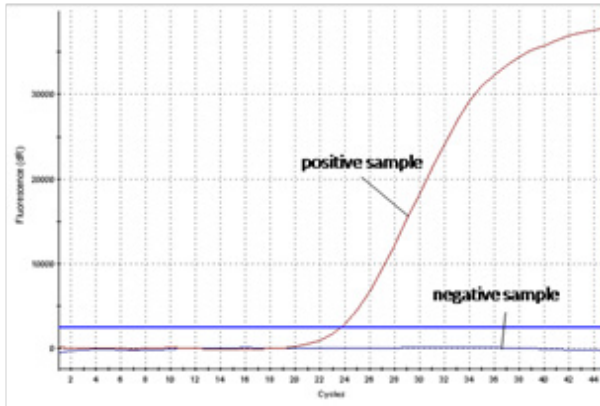


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine starke Amplifikation im pathogenspezifischen FAM-/ROX-/Cy5-Kanal, während bei der negativen Probe kein Fluoreszenzsignal detektiert wird.

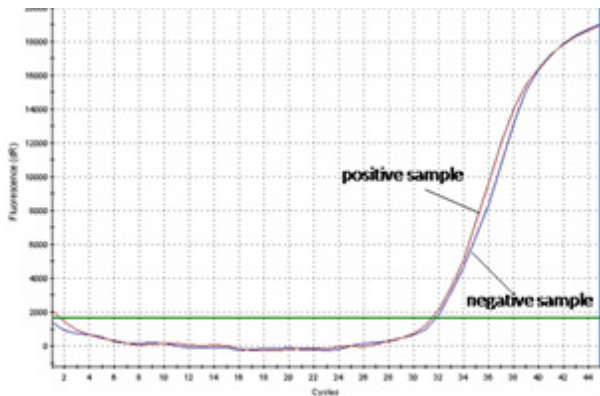


Abb. 2: Im HEX-Kanal zeigen sowohl die positive als auch die negative Probe ein Signal. In diesem Fall liegt keine Inhibition der Real-time-PCR vor, auch verlief die DNA-Extraktion erfolgreich. Die negative Probe ist somit als tatsächlich negativ zu werten.

13. VALIDIERUNGSDATEN

Negativkontrollen

Die Negativkontrolle darf keinen C_T -Wert in den Kanälen FAM, ROX, Cy5 und HEX aufweisen.

Positivkontrollen

Die Positivkontrolle muss eine positive, d.h. exponentielle Amplifikationskurve in den verschiedenen Kanälen FAM, ROX und Cy5 aufweisen. Die Positivkontrolle muss in diesen Kanälen unter einen C_T -Wert von 30 fallen.

Interne Kontrollen

Die folgenden Werte für die Amplifikation der internen Kontrollen gelten für die Verwendung des Immundiagnostik AG Nukleinsäure-Extraktionskits MutaCLEAN® Mag RNA/DNA. Die Kontroll-DNA (IPC) muss eine positive (d.h. exponentielle) Amplifikationskurve aufweisen.

Die IPC muss unter einen C_T von 34 fallen. Wenn die IPC gleich oder über C_T 34 liegt, deutet dies auf ein Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, die die IPC hemmen kann. In letzterem Fall ist der Assay gültig. Es wird empfohlen, bei jedem Lauf eine Wasserkontrolle zu extrahieren. Die IPC in der Wasserkontrolle muss unter einen C_T von 34 fallen.

Wenn andere Nukleinsäureextraktionskits verwendet werden, muss der Anwender eigene Cutoffs definieren. In diesem Fall sollte der C_T -Wert der Kontroll-DNA (IPC) in einem Eluat aus einer Probe im Vergleich zu einem Eluat aus einer extrahierten Wasserkontrolle nicht um mehr als 4 C_T verzögert sein.

14. EINSCHRÄNKUNGEN DER METHODE

- Um optimale Ergebnisse zu erzielen, ist die strikte Einhaltung der Gebrauchsanweisung erforderlich.
- Die Verwendung dieses Produkts ist auf Personal beschränkt, das speziell in den Techniken der Real-Time-PCR und der In-vitro-Diagnoseverfahren geschult ist.
- Gute Laborpraxis ist für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Assays unerlässlich.
- Alle Reagenzien sollten sorgfältig auf Verunreinigungen und Kontaminationen überwacht werden. Alle verdächtige Reagenzien sind zu verwerfen.

- Dieser Assay darf nicht direkt an einer biologischen Probe durchgeführt werden. Geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren müssen vor der Verwendung dieses Assays durchgeführt werden.
- Das Vorhandensein von PCR-Inhibitoren kann zu falsch negativen oder ungültigen Ergebnissen führen.
- Wie bei jedem diagnostischen Test müssen die Ergebnisse des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR Kits müssen unter Berücksichtigung aller klinischen und Laborbefunde interpretiert werden.

15. 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 in den spezifischen Kanälen der Positivkontrolle

Der gewählte entspricht nicht dem im Protokoll angegebenen Kanal

Wählen Sie den Kanal entsprechend dem Kapitel „Geräteeinstellungen“.

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 Kapitel „Geräteeinstellungen“.

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 Fehlen eines Signals in den spezifischen Kanälen

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

Überprüfen Sie die Real-time-PCR-Bedingungen (Kapitel „Control DNA“).

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 in den spezifischen Kanälen 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 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.

16. LEISTUNGSDATEN***16.1 Analytische Sensitivität***

Die Nachweisgrenze (LoD) des MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR-Kits wurde mit seriellen Verdünnungen synthetischer Ziel-DNA-Sequenzen in einem Roche Light-Cycler® 480 II real time PCR-Gerät bestimmt.

Die LoD des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR-Kits liegt bei mindestens 2,5 Genom-Kopien pro µl.

16.2 Analytische Spezifität

Die Spezifität des MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR-Kits wurde mit verschiedenen Ringversuchsproben mit bekanntem Status und verschiedenen anderen relevanten Viren und Bakterien, die in biologischen Proben gefunden wurden, und auf der Grundlage von *In-Silico*-Analysen bewertet.

Tabelle 6: Bakterielle und virale Erreger, die zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR-Kits getestet wurden.

Stamm	FAM channel	ROX channel	Cy5 channel	Ergebnis MRSA
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negative	negative	negative	negative
Coxsackievirus A9	negative	negative	negative	negative
Coxsackievirus B3	negative	negative	negative	negative
Cytomegalovirus	negative	negative	negative	negative
<i>Enterococcus faecalis</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Escherichia coli</i>	negative	negative	negative	negative
Herpes simplex Virus 1	negative	negative	negative	negative
Herpes simplex Virus 2	negative	negative	negative	negative
Influenza A Virus H1N1	negative	negative	negative	negative
Influenza B Virus	negative	negative	negative	negative
<i>Klebsiella spp.</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Legionella pneumophila</i> SG1	negative	negative	negative	negative
<i>Legionella pneumophila</i> SG2	negative	negative	negative	negative
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative	negative	negative	negative
Respiratory syncytial Virus A	negative	negative	negative	negative
Respiratory syncytial Virus B	negative	negative	negative	negative
SARS-CoV-2	negative	negative	negative	negative
<i>Staphylococcus aureus</i> (MSSA)	negative	negative	negative	negative
<i>Staphylococcus intermedius</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Staphylococcus sciuri</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Streptococcus ueberis</i>	negative	negative	negative	negative

Stamm	FAM channel	ROX channel	Cy5 channel	Ergebnis MRSA
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Tick-borne encephalitis Virus</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Varizella-Zoster virus</i>	negative	negative	negative	negative

Tabelle 7: Getestete Ringversuchsproben zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR-Kits.

Stamm	Erwartetes Ergebnis	MutaPLEX® PVL-MRSA Ergebnis
2025391 MRSA (<i>S. aureus</i> , PVL-neg, pSA442 neg)	MRSA positive	MRSA positive
2025392 CoNS <i>oxaS</i>	negative	negative
2025393 cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	PVL-MRSA positive	PVL-MRSA positive
2025394 cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	PVL-MRSA positive	PVL-MRSA positive
2125391 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	MRSA positive	MRSA positive
2125392 <i>Escherichia coli</i> K12	negative	negative
2125393 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	MRSA positive	MRSA positive
2125394 cMSSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaS</i> , PVL-pos)	PVL positive	PVL positive
2225391 MSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis oxaR</i> , PVL-neg)	negative	negative
2225392 <i>Escherichia coli</i> K12	negative	negative
2225393 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	MRSA positive	MRSA positive
2225394 cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	PVL-MRSA positive	PVL-MRSA positive
MRSADNA24S-01 MRSA <i>mecC</i>	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-02 MRSA N315	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-03 MRSA N315 + MRCoNS 634	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-04 MRSA N315	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-05 MSSA 29213 + MRCoNS 634	negative	negative
MRSADNA24S-06 MRSA ST398	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-07 MRSA ST398	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-08 MRSA N315 + MSSA 29213	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA24S-09 Negative	negative	negative

16.3 Linearität

Der lineare Bereich der MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time-PCR wurde durch die Analyse logarithmischer Verdünnungsreihen synthetischer DNA-Fragmente bewertet.

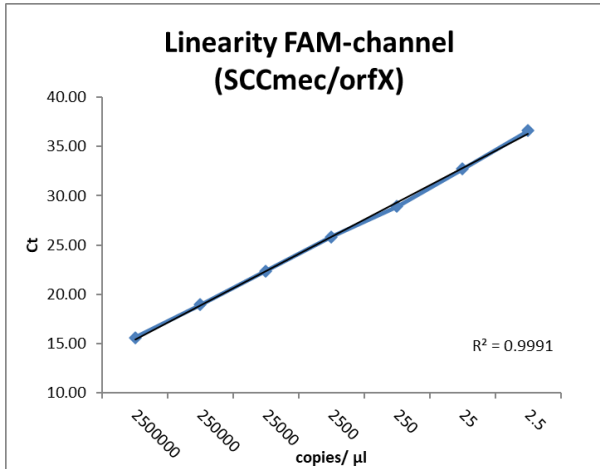


Abb. 3: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR-Kits für die *SCCmec/orfX*-Junction im FAM-Kanal.

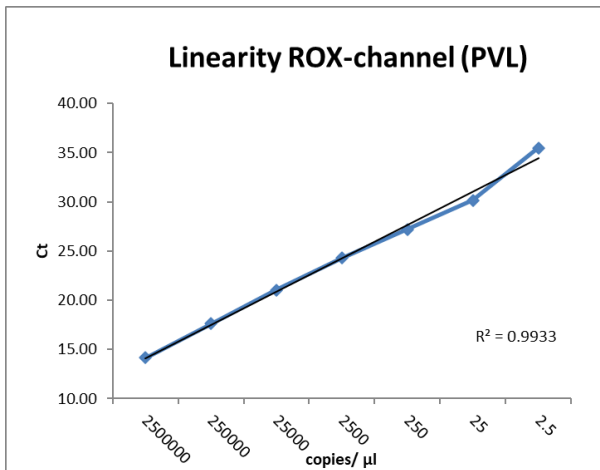


Abb. 4: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR-Kits für PVL im ROX-Kanal.

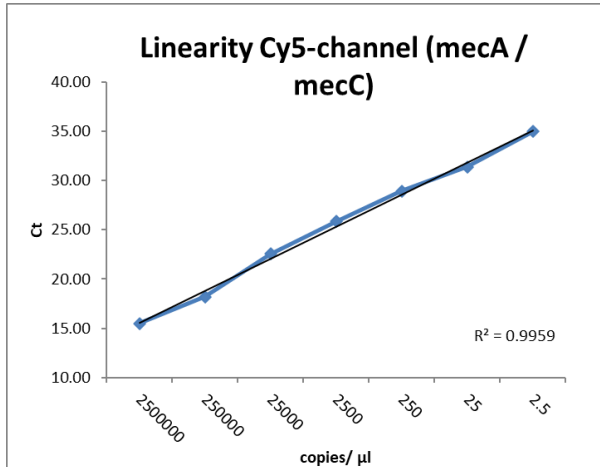


Abb. 5: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR-Kits für das mecA / mecC Gen im Cy5-Kanal.

16.4 Präzision

Die Präzision der MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR wurde als Intra-Assay-Variabilität, Inter-Assay-Variabilität und Inter-Lot-Variabilität bestimmt.

Die Variabilitätsdaten werden durch Standardabweichung und Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Daten basieren auf Quantifizierungsanalysen definierter Konzentrationen von MRSA SCCmec/orfX, MRSA mecA/mecC und PVL-spezifischer DNA sowie auf dem Threshold Cycle der Kontroll-DNA (IPC).

Tabelle 8: Präzision der MutaPLEX® PVL-MRSA Real-Time PCR.

SCCmec/orfX	Kopien / µl	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität	250	0,43	1,49
Inter-Assay Variabilität	250	0,30	1,06
Inter-Lot Variabilität	250	0,64	2,25

mecA/mecC	Kopien / µl	Standardabweichung	Variationskoeffizient [%]
Intra-Assay Variabilität	250	1,22	4,20
Inter-Assay Variabilität	250	0,26	0,87
Inter-Lot Variabilität	250	0,12	0,41

PVL	Kopien / µl	Standard-abweichung	Variationsko-effizient [%]
Intra-Assay Variabilität	250	0,10	0,36
Inter-Assay Variabilität	250	0,15	0,52
Inter-Lot Variabilität	250	0,08	0,26















Control DNA	Kopien / µl	Standard-abweichung	Variationsko-effizient [%]
Intra-Assay variability	1250	0,71	2,44
Inter-Assay variability	1250	0,22	0,74
Inter-Lot variability	1250	0,32	1,09

16.5 Diagnostische Sensitivität

Die diagnostische Sensitivität von Real-Time (RT)-PCR-Assays hängt hauptsächlich von der DNA/RNA-Extraktionsmethode ab, die zur Isolierung von DNA und RNA aus verschiedenen biologischen Proben verwendet wird. DNA/RNA-Extraktionsreagenzien sind nicht Bestandteil der Immundiagnostik AG real time (RT)-PCR-Kits. Immundiagnostik AG real time (RT)-PCR-Kits enthalten eine Extraktionskontrolle und Richtlinien für die Validierungskriterien der Extraktionskontrolle in jeder Reaktion. Die Extraktionskontrolle zeigt eine Hemmung der Real-Time (RT)-PCR und/oder eine ineffiziente Nukleinsäureextraktion an. Sie kann nicht als Kalibrator verwendet werden.

Daher garantiert Immundiagnostik AG die analytischen Sensitivitäten und Spezifitäten der Real-Time (RT)-PCR-Kits, die mit eluierter DNA und RNA aus Referenzmaterialien und Ringversuchsproben sowie mit synthetischen Nukleinsäurefragmenten durchgeführt werden. Immundiagnostik AG garantiert keine diagnostischen Sensitivitäten. Wenn in der Gebrauchsanweisung der Immundiagnostik AG Real-Time (RT)-PCR-Kits diagnostische Sensitivitäten angegeben sind, beziehen sich die Daten ausschließlich auf eine bestimmte Nukleinsäure-Extraktionsmethode, die bei der Validierung der jeweiligen Kits verwendet wurde, und sind nicht auf andere Extraktionsmethoden übertragbar. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die für die DNA/RNA-Isolierung aus biologischen Proben verwendeten Extraktionsmethoden zu qualifizieren.

17. ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

MRSA	Methicillinresist- enter <i>Staphylococ- cus aureus</i>		Katalognummer
SCCmec/orfX	Schnittstelle für <i>S. aureus</i> -DNA und SCCmec-Kassette		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
MSSA	Methicillin-emp- findlicher <i>Staphy- lococcus aureus</i>		Obere Temperatur- grenze
MR-ConS	Methicillinresist- enter, Coagulase- negativer <i>Staphy- lococcus</i>		Hersteller
mecA/mecC	Zwei Varianten des Methicillin- resistenzgens		Verwendbar bis
PVL	Panton-Valentine- Leucocidine		Lotnummer
PCR	Polymerase- Kettenreaktion		Inhalt
DNA	Deoxyribonucleic acid		Arbeitsanleitung beachten
	Reaktionsmix		<i>In-vitro</i> - Diagnostikum
	Positivkontrolle		Europäische Konformität
	Negativkontrolle		
	Kontroll-DNA		

18. 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.
3. Epidemiologisches Bulletin. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/05_18.pdf: Eigenschaften. Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland. update 2015/2016.

MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit

*For qualitative in vitro detection of Methicillin Resistant
Staphylococcus aureus (MRSA) DNA and the
differentiation of Community-acquired (CA) and
Hospital-acquired (HA) MRSA.*

Valid from 2025-04-08



KG190596



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	28
2. PATHOGEN INFORMATION	28
3. PRINCIPLE OF THE TEST	29
4. PACKAGE CONTENTS	29
5. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED	30
6. TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	30
7. WARNINGS AND PRECAUTIONS	30
8. SAMPLE MATERIAL	31
9. SAMPLE PREPARATION	32
10. CONTROL DNA	32
11. REAL TIME PCR	32
11.1 <i>Important points before starting</i>	32
11.2 <i>Procedure</i>	33
11.3 <i>Instrument settings</i>	34
12. DATA ANALYSIS	36
13. ASSAY VALIDATION	38
14. LIMITATIONS OF THE METHOD	38
15. TROUBLESHOOTING	39
16. KIT PERFORMANCE	40
16.1 <i>Analytical sensitivity</i>	40
16.2 <i>Analytical specificity</i>	40
16.3 <i>Linear range</i>	43
16.4 <i>Precision</i>	44
16.5 <i>Diagnostic Sensitivity</i>	45
17. ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	46
18. LITERATURE	47

1. INTENDED USE

The MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit is a multiplex real time PCR for the qualitative detection of the nucleic acid of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and the differentiation of Community-acquired (CA) and Hospital-acquired (HA) MRSA in eluates from biological specimens. The assay is an in vitro diagnostic medical device and intended to be used by professional users in a laboratory environment. It can be performed manually or using an automated platform. The assay serves as an aid in the diagnosis, screening and monitoring of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).

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 *S. aureus* because the bacteria are frequently part of the skin flora found in the nose and on skin. *S. 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. MRSA is the leading cause of nosocomial infections worldwide (hospital-acquired MRSA, also called HA-MRSA). Beside HA-MRSA infections, also community-acquired MRSA infections (CA-MRSA) occur, which are acquired outside the hospital. In the recent years, also MRSA infections associated with livestock (livestock-associated MRSA or LA-MRSA) emerged, especially with pig farmers.

Since the mid-1990s, the number of infections in the population increased with no previous history of medical facility contact. This increase in infections in the population is caused by *Staphylococcus aureus* strains that carry the virulence factor Pantone-Valentine leucocidin (PVL). Infections tend to occur in healthy younger people. PVL can be produced by methicillin-sensitive MSSA as well as MRSA. MRSA strains that carry the virulence factor PVL are called CA-MRSA. Pantone-Valentine leucocidin is a bicomponent, poreforming cytotoxin. This cytotoxin lyses macrophages as well as neutrophil granulocytes and contributes to tissue necrosis. The clinical manifestation of PVL-positive *Staphylococcus aureus* strains are skin and soft tissue infections, particularly recurrent invasive abscesses. Rarely, necrotizing pneumonia develops with a mortality rate of up to 75%. Risk groups for transmission of CA-MRSA or PVL-MSSA are for example families, persons performing close contact sports, persons from educational settings, prisoners and military personnel.

3. PRINCIPLE OF THE TEST

The MutaPLEX® PVL-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® PVL-MRSA real time PCR kit allows the detection of the methicillin resistance gene *mecA/mecC* to eliminate false positive results through dropout mutants. Additionally, the PVL gene is detected.

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. The fluorescence of PVL-specific probes is detected in the ROX channel.

Furthermore, MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit contains a control DNA (internal process control, IPC), 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 biological specimen. The fluorescence of the control DNA is measured in the HEX channel.

4. PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 96 reactions.

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

Label	Lid Colour	Content
Reaction Mix	yellow	1 x 1344 µl
Positive control	red	1 x 150 µl
Negative control	green	1 x 150 µl
Control DNA	colourless	1 x 480 µl

5. MATERIALS REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

- DNA purification kit (e.g. MutaCLEAN® Universal RNA/DNA, KG1038. or the magnet particle-based system MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023)
- PCR grade water
- Sterile microtubes
- Pipets (adjustable volume)
- DNase/RNase-free disposable pipette tips with aerosol barriers
- Tabletop centrifuge
- Vortex mixer
- Real time PCR instrument
- If using a Roche LightCycler® 480 II device, the Colour Compensation kit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) is required.
- Optical PCR reaction tubes or optical PCR reaction plates with optical foil
- Optional: Liquid handling system for automation

6. TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY

The MutaPLEX® PVL-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. WARNINGS AND PRECAUTIONS

- Read the instructions for use carefully before using the product.
- Before first use check the product and its components for completeness.
- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of real-time PCR procedures.
- Specimens should always be treated as infectious and/or biohazardous in accordance with safe laboratory procedures.

- Avoid microbial and nuclease (DNase/RNase) contamination of the eluates and the components of the kit.
- Always use DNase/RNase-free disposable pipet tips with aerosol barriers.
- Always wear protective disposable powder-free gloves when handling kit components.
- Use separated and segregated working areas for (1) sample preparation, (2) reaction setup and (3) amplification/detection activities. The workflow in the laboratory should proceed in unidirectional manner. Always wear disposable gloves in each area and change them before entering a different area.
- Dedicate supplies and equipment to the separate working areas and do not move them from one area to another.
- Store positive and/or potentially positive material separated from all other components of the kit.
- Do not open the optical PCR reaction tubes/plates post amplification, to avoid contamination with amplicons.
- Additional controls may be tested according to guidelines or requirements of local, state and/or federal regulations or accrediting organizations.
- Do not autoclave reaction tubes after the PCR, since this will not degrade the amplified nucleic acids and will bear the risk to contaminate the laboratory area.
- Discard sample and assay waste according to your local safety regulations.
- Do not mix components of different lots.

8. SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit is DNA isolated from biological specimens. By the nature of the pathogens, sample material like nasal swabs or skin swabs is commonly used.

9. SAMPLE PREPARATION

Purified DNA is suitable for downstream processing in real time PCR. For the extraction and purification of DNA from various biological materials, commercial kits for DNA isolation such as MutaCLEAN® Universal RNA/DNA (KG1038) or the magnet particle-based system MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023) are recommended. The operator needs to evaluate the suitability of the respective DNA extraction kit.

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 10 “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.

10. CONTROL DNA

A control DNA (internal process control, IPC) is supplied as extraction control. This allows the user to control the DNA isolation procedure and to check for possible real time PCR inhibition.

Add 5 µl control DNA per extraction (5 µl x (N+1)). Mix well. Perform the DNA isolation according to the manufacturer's instructions.

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

11. REAL TIME PCR

11.1 *Important points before starting*

- Please pay attention to chapter 7 “Warnings and precautions”.
- 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.

11.2 Procedure

The master mix contains all of the components needed for PCR except the sample. Calculate 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

Volume per reaction	Volume master mix
14 µl Reaction Mix	14 µl x (N+1)

Real time PCR set up

- Place the number of optical PCR reaction tubes needed into the respective tray of the real time PCR instrument / take an optical PCR reaction plate.
- Pipet **14 µl** of the master mix into each optical PCR reaction tube / well of the optical PCR reaction plate.
- Add **6 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 / optical PCR reaction plate (table 3).
- Close the optical PCR reaction tubes / optical PCR reaction plate immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.
- Place the optical PCR reaction tubes or optical PCR reaction plate into the real time PCR instrument.

Table 3: Preparation of the real time PCR

Component	Volume
Master mix	14.0 µl
Sample	6.0 µl
Total volume	20.0 µl

11.3 Instrument settings

For the real time PCR use the thermal profile shown in table 4.

Table 4: 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	
	Acquisition at the end of this step		

The real time PCR thermal profile mentioned above represents the universal settings for Immundiagnostik real time PCR and real time RT-PCR kits. Therefore, different kits can be used in the same run. For Immundiagnostik real time PCR kits used for amplification of DNA, the reverse transcription can be omitted. Depending on the real time instrument used, further instrument settings have to be adjusted according to table 5.

Table 5: Overview of the instrument settings required for the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR.

Real time PCR Instrument	Parameter	Detection Channel	Notes		
LightCycler 480II	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	FAM (465-510) HEX (533-580) ROX (533-610) CY5 (618-660)	Color compensation kit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) required		
			Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)
			1	10	1
			1	10	2
			1	10	2
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P Aria MX	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	FAM HEX ROX Cy5	Gain 8	Reference dye: none	
			Gain 1		
			Gain 1		
			Gain 4		
ABI 7500 QuantStudio 5 CFX96 CFX Opus 96	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	FAM HEX ROX Cy5	Option reference dye ROX: NO		
Rotor-Gene Q Rotor-Gene 3000 Rotor-Gene 6000	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	Green Yellow Orange Red	Gain 5		
			Gain 5		
			Gain 5		
			Gain 5		
Mic Q-PCR cycler	SCCmec/orfX Control DNA PVL mecA/mec	Green Yellow Orange Red	Gain 8		
			Gain 10		
			Gain 10		
			Gain 10		

12. DATA ANALYSIS

The following results can occur:

FAM SCCmec/ orfX	ROX PVL	Cy5 mecA/ mecC	HEX Control DNA	MRSA	Interpretation
+	+	+	positive or negative*	positive	Community-acquired MRSA (CA-MRSA. PVL-positive). The result for the control DNA is irrelevant.
+	-	+	positive or negative*	positive	Hospital-acquired MRSA (HA-MRSA. PVL-negative). The result for the control DNA is irrelevant.
+	+	-	positive or negative*	negative	CA-MSSA (methicillin sensitive). The result for the control DNA is irrelevant.
+	-	-	positive or negative*	negative	MSSA. The result for the control DNA is irrelevant.
-	+	+	positive or negative*	negative	CA-MSSA and MR-ConS. The result for the control DNA is irrelevant.
-	+	-	positive or negative*	negative	CA-MSSA. The result for the control DNA is irrelevant.
-	-	+	positive or negative*	negative	MR-ConS. The result for the control DNA is irrelevant.
-	-	-	≤ 34**	negative	MRSA negative.
-	-	-	> 34** or negative	?	Not interpretable.

* A strong positive signal in the FAM, and/or ROX and/or Cy5 channel can inhibit the Control DNA (IPC). In such cases, the result for the control DNA can be neglected.

** In case of high C_T values, the IPC should be compared to the water extraction control as described in the chapter 'Assay validation'.

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

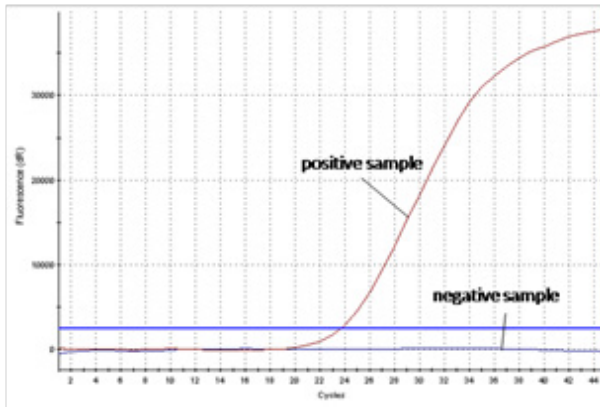


Figure 1: The positive sample shows amplification signal in the specific channel (FAM/Cy5/ROX), whereas no fluorescence signal is detected in the negative sample.

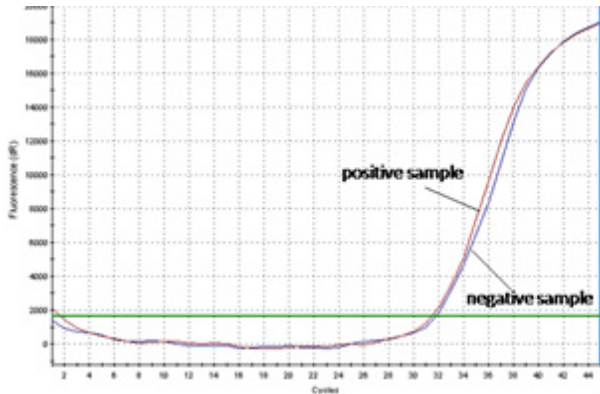


Figure 2: The positive sample as well as the negative sample show a signal in the control DNA-specific HEX channel. The amplification signal of the control DNA in the negative sample shows that the missing signal in the specific channel (FAM/Cy5/ROX) is not due to PCR inhibition or failure of DNA isolation, but that the sample is a true negative.

13. ASSAY VALIDATION

Negative controls

The Negative Control must show no C_T in the FAM, ROX, Cy5 and HEX channels.

Positive controls

The Positive Control must show a positive (i.e. exponential) amplification curve in the different channels FAM, ROX and Cy5. The Positive Control must fall below C_T 30 in those channels.

Internal controls

The following values for the amplification of the internal controls are valid using Im-mundiagnostik AG nucleic acid extraction kit MutaCLEAN® Mag RNA/DNA. The Control DNA (IPC) must show a positive (i.e. exponential) amplification curve.

The IPC must fall below a C_T of 34. If the IPC is equal or above C_T 34 this points to a purification problem or a strong positive sample that can inhibit the IPC. In the latter case, the assay is valid. It is recommended to perform the extraction of a water control in each run. The IPC in the water control must fall below a C_T of 34.

If other nucleic acid extraction kits are used, the user must define own cutoffs. In this case the C_T value of the Control DNA (IPC) in an eluate from a sample should not be delayed for more than 4 C_T in comparison to an eluate from an extracted water control.

14. LIMITATIONS OF THE METHOD

- Strict compliance with the instructions for use is required for optimal results.
- Use of this product is limited to personnel specially instructed and trained in the techniques of real-time PCR and in vitro diagnostic procedures.
- Good laboratory practice is essential for proper performance of this assay.
- All reagents should be closely monitored for impurity and contamination. Any suspicious reagents should be discarded.
- This assay must not be used on a biological specimen directly. Appropriate nucleic acid extraction methods have to be conducted prior to using this assay.
- The presence of PCR inhibitors may cause false negative or invalid results.

- As with any diagnostic test, results of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit need to be interpreted in consideration of all clinical and laboratory findings.

15. TROUBLESHOOTING

The following troubleshooting guide is included to help you with possible problems that may arise when performing a real time PCR. If you have further questions, please do not hesitate to contact our scientists on info@immundiagnostik.com.

No fluorescence signal in the specific channels of the positive control

The selected channel for analysis does not comply with the protocol

Select the channel according to chapter "Instrument settings".

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 chapter "Instrument settings".

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 specific channels

Real time PCR conditions do not comply with the protocol

Check the real time PCR conditions (chapter "Control DNA").

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 that 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 follow 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 specific 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.

16. KIT PERFORMANCE

16.1 Analytical sensitivity

The limit of detection (LoD) of MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit was determined using serial dilutions of synthetic target DNA sequences on a Roche LightCycler® 480 II real time PCR instrument. The LoD of MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit is at least 2.5 genome copies per µl each.

16.2 Analytical specificity

The specificity of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit was evaluated with different ring trial samples of known status and different other relevant viruses and bacteria found in biological samples and basing on in silico analyses.

All ring trial samples and other eluates with known status were detected correctly. Results are shown in Table 6 and Table 7.

Table 6: Bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit.

Strain	FAM channel	ROX channel	Cy5 channel	result MRSA
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negative	negative	negative	negative
Coxsackievirus A9	negative	negative	negative	negative
Coxsackievirus B3	negative	negative	negative	negative
Cytomegalovirus	negative	negative	negative	negative
<i>Enterococcus faecalis</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Escherichia coli</i>	negative	negative	negative	negative
Herpes simplex Virus 1	negative	negative	negative	negative
Herpes simplex Virus 2	negative	negative	negative	negative
Influenza A Virus H1N1	negative	negative	negative	negative
Influenza B Virus	negative	negative	negative	negative
<i>Klebsiella spp.</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Legionella pneumophila SG1</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Legionella pneumophila SG2</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative	negative	negative	negative
Respiratory syncytial Virus A	negative	negative	negative	negative
Respiratory syncytial Virus B	negative	negative	negative	negative
SARS-CoV-2	negative	negative	negative	negative
<i>Staphylococcus aureus (MSSA)</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Staphylococcus intermedius</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Staphylococcus sciuri</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Streptococcus ueberis</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negative	negative	negative	negative
<i>Streptococcus dysgalactiae</i>	negative	negative	negative	negative
Tick-borne encephalitis Virus	negative	negative	negative	negative
Varizella-Zoster virus	negative	negative	negative	negative

Table 7: Ring trial samples tested for the determination of the analytical specificity of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR kit.

Strain	Expected result	MutaPLEX® PVL-MRSA Result
2025391 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg, pSA442 neg)	MRSA positive	MRSA positive
2025392 CoNS <i>oxaS</i>	negative	negative
2025393 cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	PVL-MRSA positive	PVL-MRSA positive
2025394 cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	PVL-MRSA positive	PVL-MRSA positive
2125391 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	MRSA positive	MRSA positive
2125392 <i>Escherichia coli</i> K12	negative	negative
2125393 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	MRSA positive	MRSA positive
2125394 cMSSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaS</i> , PVL-pos)	PVL positive	PVL positive
2225391 MSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> <i>oxaR</i> , PVL-neg)	negative	negative
2225392 <i>Escherichia coli</i> K12	negative	negative
2225393 MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	MRSA positive	MRSA positive
2225394 cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	PVL-MRSA positive	PVL-MRSA positive
MRSADNA245-01 MRSA <i>mecC</i>	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-02 MRSA N315	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-03 MRSA N315 + MRCoNS 634	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-04 MRSA N315	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-05 MSSA 29213 + MRCoNS 634	negative	negative
MRSADNA245-06 MRSA ST398	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-07 MRSA ST398	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-08 MRSA N315 + MSSA 29213	MRSA positive	MRSA positive
MRSADNA245-09 Negative	negative	negative
MRSADNA245-10 MRSA N315	MRSA positive	MRSA positive

16.3 Linear range

The linear range of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR was evaluated by analysing logarithmic dilution series of synthetic DNA fragments.

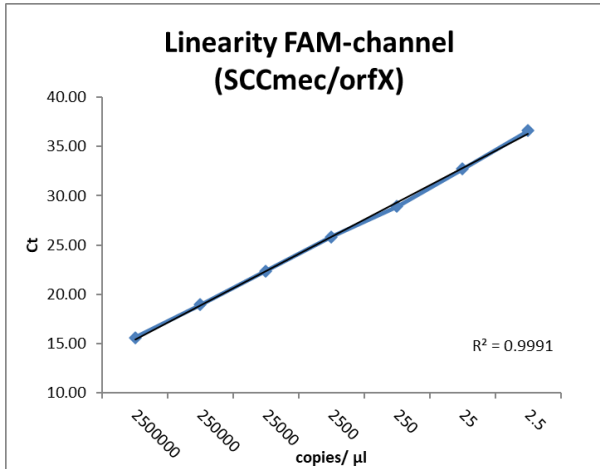


Figure 3: Determination of the linear range of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR Kit for the SCCmec/orfX junction in the FAM channel.

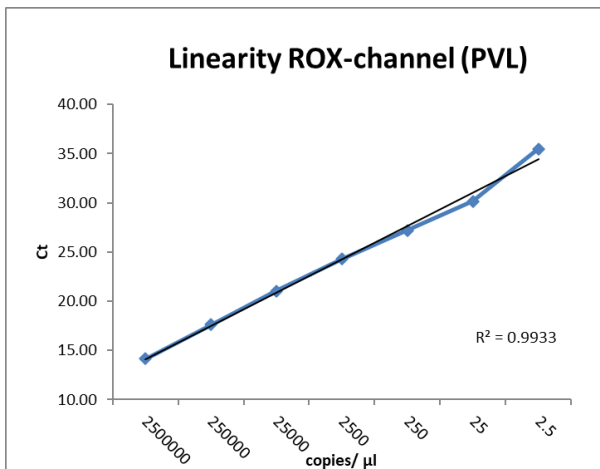


Figure 4: Determination of the linear range of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR Kit for PVL in the ROX channel.

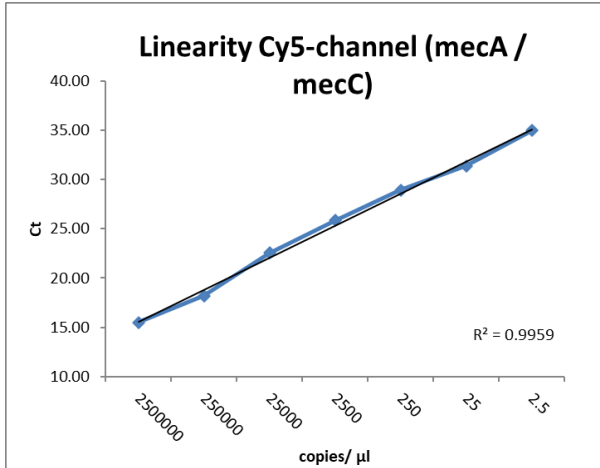


Figure 5: Determination of the linear range of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR Kit for *mecA* / *mecC* gene in the Cy5 channel.

16.4 Precision

The precision of the MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR was determined as intra-assay variability, inter-assay variability and inter-lot variability.

Variability data are expressed by standard deviation and coefficient of variation. The data are based on quantification analyses of defined concentrations of MRSA SC-Cmec/orfX, MRSA *mecA*/*mecC* and PVL specific DNA and on the threshold cycle of the control DNA (IPC).

Table 8: Precision of MutaPLEX® PVL-MRSA real time PCR.

SCCmec/orfX	copies / μl	Standard deviation	Coefficient of variation [%]
Intra-Assay variability	250	0.43	1.49
Inter-Assay variability	250	0.30	1.06
Inter-Lot variability	250	0.64	2.25

<i>mecA</i> / <i>mecC</i>	copies / μl	Standard deviation	Coefficient of variation [%]
Intra-Assay variability	250	1.22	4.20
Inter-Assay variability	250	0.26	0.87
Inter-Lot variability	250	0.12	0.41

PVL	copies / μl	Standard deviation	Coefficient of variation [%]
Intra-Assay variability	250	0.10	0.36
Inter-Assay variability	250	0.15	0.52
Inter-Lot variability	250	0.08	0.26















Control DNA	copies / μl	Standard deviation	Coefficient of variation [%]
Intra-Assay variability	250	0.71	2.44
Inter-Assay variability	250	0.22	0.74
Inter-Lot variability	250	0.32	1.09

16.5 Diagnostic Sensitivity

The diagnostic sensitivity of real time (RT-) PCR assays is mainly dependent on the DNA/RNA extraction method used to isolate DNA and RNA from various biological specimens. DNA/RNA extraction reagents are not part of the Immundiagnostik AG real time (RT-)PCR kits. Immundiagnostik AG real time (RT-)PCR kits include an extraction control and guidelines for the validation criteria of the extraction control in each reaction. The extraction control indicates inhibition of the real time (RT-)PCR and/or inefficient nucleic acid extraction. It cannot be used as a calibrator.

Therefore, Immundiagnostik AG guarantees the analytical sensitivities and specificities of the real time (RT-)PCR kits, performed with eluted DNA and RNA from reference materials and ring trial samples and with synthetic nucleic acid fragments. Immundiagnostik AG does not guarantee diagnostic sensitivities. If diagnostic sensitivities are mentioned in the instructions for use of Immundiagnostik AG real time (RT-)PCR kits, the data are strictly correlated to a specific nucleic acid extraction method that has been used during the validation of the respective kits and cannot be transferred to other extraction methods. It is the responsibility of the user to qualify the extraction methods used for DNA/RNA isolation from biological samples.

17. ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>		Catalog number
SCCmec/orfX	Junction for <i>S. aureus</i> DNA and SCCmec cassette		Contains sufficient for <n> test
MSSA	Methicillin-sensitive <i>Staphylococcus aureus</i>		Upper limit of temperature
MR-ConS	Methicillin-resistant coagulase negative <i>Staphylococcus</i>		Manufacturer
mecA / mecC	Two variants of the methicillin resistance gene		Use by YYYY-MM-DD
PVL	Panton-Valentine-leucocidine		Lot number
DNA	Deoxyribonucleic acid		Content
PCR	Polymerase Chain Reaction		Consult instructions for use
	Reaction Mix		In vitro diagnostic medical device
	Positive control		European Conformity
	Negative control		
	Control DNA		

18. 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.
3. Epidemiologisches Bulletin. https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/EpidBull/Archiv/2018/Ausgaben/05_18.pdf: Eigenschaften. Häufigkeit und Verbreitung von MRSA in Deutschland. update 2015/2016.

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

