

MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR kit

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

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

Gültig ab / Valid from 2021-10-15



KG194196



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	3
7	WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN	3
8	PROBENMATERIAL	4
9	PROBENVORBEREITUNG	4
10	KONTROLL-DNA	4
11	REAL-TIME-PCR	5
	11.1 <i>Wichtige Hinweise vor Beginn</i>	5
	11.2 <i>Durchführung</i>	5
	11.3 <i>Geräteeinstellungen</i>	6
12	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE	8
13	VALIDIERUNGSDATEN	10
14	EINSCHRÄNKUNGEN	11
15	PROBLEMBEHANDLUNG	12
16	LEISTUNGSDATEN	14
	16.1 <i>Analytische Sensitivität</i>	14
	16.2 <i>Analytische Spezifität</i>	14
	16.3 <i>Linearität</i>	18
	16.4 <i>Präzision</i>	19
	16.5 <i>Diagnostische Sensitivität und Spezifität</i>	20
17	ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE	20
18	LITERATUR	21

1 VERWENDUNGSZWECK

Der MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kit dient dem Nachweis von MRSA-DNA in biologischen Proben.

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 seqc Real-time-PCR-Kit enthält spezifische Primer und fluoreszenzfarbstoffmarkierte Sonden für die Amplifikation von MRSA-DNA in biologischen Proben. Die PCR detektiert die *SCCmec/orfX 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 HEX-Kanal.

Zusätzlich enthält der MutaPLEX® MRSA seqc Real-time-PCR-Kit eine interne Systemkontrolle (ISC). Die ISC besteht aus Primern und Sonden für den Nachweis eines

Housekeeping-Gens (Succinatdehydrogenase) im Eluat von humanen biologischen Proben. Die ISC hilft, falsch negative Ergebnisse aufgrund einer unzureichenden Probenentnahme oder eines unsachgemäßen Transports zu vermeiden. Die Amplifikation der Succinatdehydrogenase-Zielsequenz wird im ROX-Kanal gemessen.

4 INHALT DER TESTPACKUNG

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

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

Bezeichnung	Deckelfarbe	Inhalt
		96
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 ERFORDERLICHE LABORGERÄTE UND HILFSMITTEL

- DNA-Extraktionskit (z. B. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023/KG1024)
- Reinstwasser*
- Sterile Reaktionsgefäße
- Pipetten (variable Volumina)
- sterile Pipettenspitzen mit Filter
- Tischzentrifuge
- Vortex-Wirbelmischer
- Real-time-PCR-Gerät
- optische PCR-Gefäße mit Deckel oder optische PCR-Reaktionsplatte mit optischer Folie
- optional: Pipettiergeräte zur Automation

* 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 WARNUNGEN UND VORSICHTSMASSNAHMEN

- Der Assay ist immer nach der dem Kit beigefügten Arbeitsanleitung durchzuführen.
- Die MutaPLEX® MRSA seqc Real-Time-PCR muss in für diesen Zweck geeigneten Laboratorien und von speziell geschultem Personal durchgeführt werden.
- Alle Proben müssen als potentiell infektiös betrachtet werden und alle mit den Proben in Berührung kommenden Gegenstände müssen als potentiell kontaminiert erachtet werden.
- 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.
- Bei Verwendung der Kitkomponenten sind stets puderfreie Einmalschutzhandschuhe zu tragen
- Pipetten und Arbeitsflächen regelmäßig mit geeigneter Dekontaminationslösung reinigen (keine ethanolhaltigen Mittel).
- Kontaminationen der Eluate und Kitkomponenten mit Mikroben oder Nukleasen (RNAsen und DNAsen) sind zu vermeiden.
- Positives und potentiell positives Material muss stets von allen anderen Kitkomponenten separiert bleiben.
- Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um Verunreinigungen zu vermeiden.

- Gemäß Richtlinien oder Anforderungen lokaler, staatlicher oder bundesstaatlicher Vorschriften oder bevollmächtigter Organisationen können zusätzliche Kontrollen getestet werden.
- Reaktionsgefäße nach der PCR nicht autoklavieren, da dies die amplifizierten Nukleinsäure nicht degradieren wird und das Risiko beinhaltet den Laborbereich zu kontaminieren.
- Entsorgen Sie die Proben und Testabfälle gemäß Ihrer örtlichen Sicherheitsvorschriften.

8 PROBENMATERIAL

Das Ausgangsmaterial für den MutaPLEX® MRSA seqc Real-time-PCR-Kit ist bakterielle DNA, die aus biologischen Proben isoliert wurde.

9 PROBENVORBEREITUNG

Die MutaPLEX® MRSA seqc Real-time-PCR ist geeignet für den Nachweis von MRSA-DNA, die zuvor aus mit Hilfe geeigneter Methoden aus biologische Proben isoliert wurde. Kommerziell erhältliche Extraktionskits können zur DNA-Isolierung verwendet werden. Immundiagnostik empfiehlt MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023/KG1024).

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

Der MutaPLEX® MRSA seqc Real-time-PCR enthält eine Kontroll-DNA, die als DNA-Extraktionskontrolle dient. Dies ermöglicht dem Anwender die Kontrolle der DNA-Extraktion und die Überprüfung auf mögliche Real-Time-PCR Inhibitoren

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.

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

- Benötigte Anzahl optischer PCR-Reaktionsgefäße in den Kühlblock des Real-time-PCR-Geräts stellen / eine optische PCR-Reaktionsplatte verwenden.
- 14 µl des Master-Mix in jedes Gefäß / in jeder Vertiefung der optischen PCR-Reaktionsplatte pipettieren.
- 6 µl der DNA-Eluat (inklusive des Eluats der Wasserkontrolle), die Positivkontrolle und die Negativkontrolle in die entsprechenden Gefäße / in die entsprechenden Vertiefungen der optischen PCR-Reaktionsplatte pipettieren (Tabelle 3).
- Die Reaktionsgefäße / die optische PCR-Reaktionsplatte 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 oder 5 beschriebene Temperaturprofil zu benutzen.

Tabelle 4: Real-time-PCR-Temperaturprofil

Beschreibung	Dauer	Temperatur	Zyklusanzahl
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			

Wenn im gleichen Lauf Proben auf Erreger mit RNA-Genom getestet werden sollen, verwenden Sie das in Tabelle 5 dargestellte Temperaturprofil.

Tabelle 5: 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 6 aufgelistete Einstellungen vorgenommen werden.

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

Real-time-PCR-Gerät	Parameter	Detektionskanal	Bemerkungen		
LightCycler 480II	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	465-510 533-580 533-610 618-660	Colour compensation Kit MutaPLEX® CC-1 (KG19-5-CC) erforderlich		
			Melt factor	Quant factor	Max integration time (s)
			1	10	1
			1	10	2
			1	10	3
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	FAM	Gain 8	Reference dye: none	
		HEX	Gain 1		
		ROX	Gain 1		
		Cy5	Gain 4		
QuantStudio 5 Bio-Rad CFX96 Bio-Rad CFX Opus 96	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	FAM	Option reference dye ROX: NO		
		HEX			
		ROX			
		Cy5			
Mic qPCR Cycler	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	Green	Gain 8		
		Yellow	Gain 10		
		Red	Gain 10		
		Orange	Gain 10		

12 INTERPRETATION DER ERGEBNISSE

Folgende Ergebnisse können auftreten:

Tabelle 7: Überblick über die möglichen Ergebnisse der MutaPLEX® MRSA seq Real-time-PCR.

Signal/ C _T -Werte				Interpretation
FAM-Kanal SCCmec/orfX	Cy5-Kanal Resistenzgen mecA/mecC	ROX-Kanal ISC	HEX-Kanal IPC	
positiv	positiv	positiv oder negativ ¹	positiv oder negativ ²	Positives Ergebnis, die Probe enthält MRSA-DNA.
positiv	negativ	positiv oder negativ ¹	positiv oder negativ ²	Negatives Ergebnis, die Probe enthält MS-MRSA-DNA.
negativ	positiv	positiv oder negativ ¹	positiv oder negativ ²	Negatives Ergebnis, die Probe enthält MR-CoNS-DNA.
negativ	negativ	positiv	≤ 34 ³	Negatives Ergebnis, die Probe enthält weder MRSA-, MS-MRSA- noch MR-CoNS-DNA.
negativ	negativ	negativ	negativ oder > 34 ³	Es kann keine diagnostische Aussage getroffen werden. Die Real-time-PCR ist entweder inhibiert oder es traten Fehler während der DNA-Extraktion auf.

¹ Wenn die analysierten Proben aus Zellkulturen kommt, kann der ROX-Kanal negativ sein.

² Ein starkes positives Signal im FAM oder Cy5 kann die IPC hemmen. In solchen Fällen kann das Ergebnis für die Kontroll-DNA vernachlässigt werden.

³ Bei hohen C_T-Werten sollte die IPC mit der Wasserextraktionskontrolle verglichen werden, wie wie im Kapitel „Validierungsdaten“ beschrieben.

Abbildungen 1 - 4 zeigen Beispiele für positive und negative Real-time-PCR-Ergebnisse.

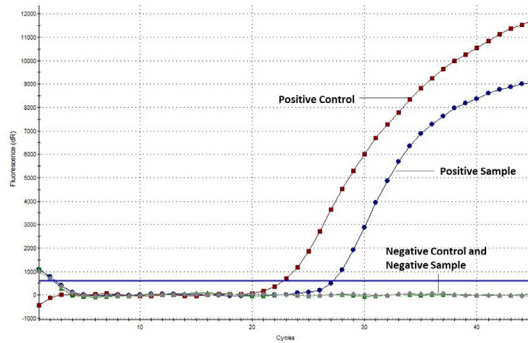


Abb. 1: Die positive Probe zeigt eine pathogenspezifische Amplifikation im FAM-Kanal (Positive Probe und Positivkontrolle), während in einer negativen Probe und der Negativkontrolle kein Fluoreszenzsignal zu erkennen ist (Mx3005P).

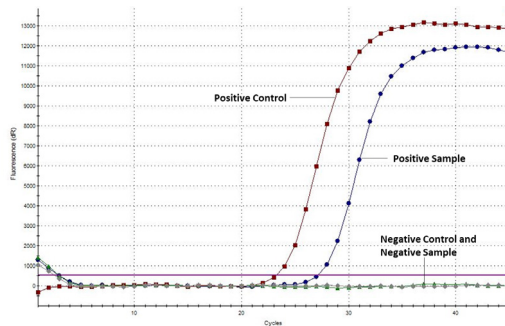


Abb. 2: Die positive Probe zeigt eine pathogenspezifische Amplifikation im Cy5-Kanal (Positive Probe und Positivkontrolle), während in einer negativen Probe und der Negativkontrolle kein Fluoreszenzsignal zu erkennen ist (Mx3005P).

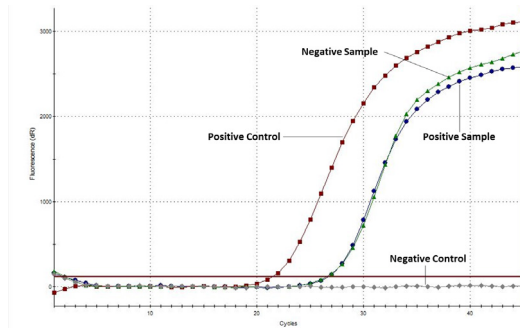


Abb. 3: Signale der Amplifikation der ISC im ROX-Kanal. Das Amplifikationssignal in der positiven und der negativen Probe zeigt eine ausreichende Menge an DNA im Probeneluat an und bestätigt die Integrität der Probenahme (Mx3005P).

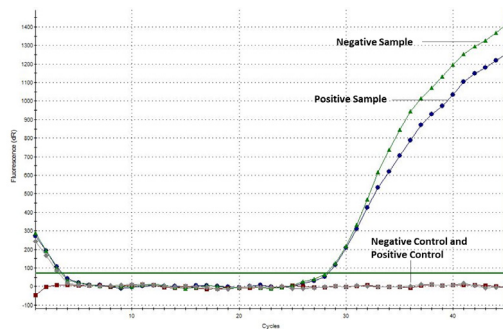


Abb. 4: Die positive Probe und die negative Probe zeigen ein Signal im Kontroll-DNA spezifischen HEX-Kanal (IPC). Das Amplifikationssignal der Kontroll-DNA in der Negativprobe zeigt, dass die fehlenden Signale in den pathogenspezifischen Kanälen FAM und Cy5 nicht auf eine PCR-Inhibition oder eine fehlgeschlagene DNA-Isolierung zurückzuführen sind, sondern dass es sich bei der Probe um eine echte Negativprobe handelt (Mx3005P).

13 VALIDIERUNGSDATEN

Negativkontrolle

Die Negativkontrolle darf keinen C_T -Wert im FAM-, Cy5-, ROX- und HEX-Kanal aufweisen.

Positivkontrolle

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

Interne Kontrollen

Die folgenden Werte für die Amplifikation der internen Kontrollen sind, unter Verwendung des Immundiagnostik AG Nukleinsäure-Extraktionskits MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023/KG1024) gültig. Alle internen Kontrollen (ISC und IPC, seqc - Proben- und Extraktionsqualitätskontrolle) müssen eine positive (d.h. exponentielle) Amplifikationskurve aufweisen.

Die Kontroll-DNA (IPC) muss unter einen C_T von 34 fallen. Liegt die Kontroll-DNA über C_T 34, deutet dies auf ein Aufreinigungsproblem oder eine stark positive Probe hin, die IPC hemmen kann. In letzterem Fall ist der Assay gültig. Es wird empfohlen die Extraktion einer Wasserkontrolle in jedem Lauf durchzuführen. Die IPC in der Wasserkontrolle Kontrolle muss unter einen C_T von 34 fallen.

Bei sorgfältig entnommenen Atemwegstupferproben zeigt der ISC C_T -Werte von ca. 15 bis ca. 28. Ein stark verzögertes Signal mit einem C_T von > 34 zeigt eine geringe Probenmenge. Falsch negative Ergebnisse sind daher nicht auszuschließen.

Falls weder im FAM- noch im Cy5-Kanal Amplifikationen auftreten, muss eine Amplifikationskurve im ROX-Kanal (ISC) und im HEX-Kanal (IPC) stattfinden, wenn Eluate von humanen Primärproben verwendet werden.

Werden andere Nukleinsäure-Extraktionskits verwendet, 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 um nicht mehr als 4 C_T verzögert sein.

14 EINSCHRÄNKUNGEN

- Für optimale Ergebnisse 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-Diagnostik geschult ist.
- Gute Laborpraxis (GLP) ist für die ordnungsgemäße Durchführung dieses Assays unerlässlich.
- Alle Reagenzien sollten sorgfältig auf Verunreinigungen und Kontaminationen überwacht werden. Alle verdächtigen Reagenzien sollten verworfen werden.
- Dieser Assay darf nicht direkt an einer biologischen Probe durchgeführt werden. Geeignete Nukleinsäureextraktionsverfahren müssen vor der Verwendung dieses Tests 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® MRSA seqc real-time-PCR-Kits 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 AG unter info@immundiagnostik.com.

Kein Fluoreszenzsignal im FAM-, Cy5- oder ROX-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, den ROX-Kanal für die Amplifikation der ISC und den HEX-Kanal für die Amplifikation der Kontroll-DNA (IPC).

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 (Tabellen 4 und 5).

Falsche Lagerbedingungen des Kits oder abgelaufenes Haltbarkeitsdatum

Überprüfen Sie die Lagerbedingungen und das Haltbarkeitsdatum auf dem Kitetikett. 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 (IPC) und gleichzeitiges Ausbleiben eines Signals im MRSA-spezifischen 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 11).

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, Lagerung und Stabilität“ beschrieben.

Detektion eines Signals im FAM- und/oder Cy5-Kanal der Negativkontrolle***Kontamination bei der Vorbereitung der PCR***

Wiederholen Sie die Real-Time-PCR in Replikaten. Wenn das Ergebnis bei der Wiederholung negativ ist, ist die Kontamination beim Pipettieren der Proben in die optischen PCR-Reaktionsgefäße entstanden. Achten Sie darauf, die Positivkontrolle zuletzt zu pipettieren und das optische PCR-Reaktionsgefäß sofort nach Zugabe der Probe zu schließen. Wenn das gleiche Ergebnis auftritt, sind möglicherweise eine oder mehrere Komponenten des Kits kontaminiert. Achten Sie darauf, dass der Arbeitsbereich und die Instrumente regelmäßig dekontaminiert werden. Verwenden Sie einen neuen Kit und wiederholen Sie die Real-Time-PCR.

Detektion eines Signals im ROX-Kanal der Negativkontrolle***Kontamination des Real-time-PCR-Ansatzes mit humaner DNA***

Solange der ROX-Kanal sehr hohe C_T -Werte aufweist, ist die Kontamination vernachlässigbar.

Wenn der FAM- und Cy5-Kanal in der Negativkontrolle negativ sind, ist die PCR immer noch für den Nachweis von MRSA geeignet.

16 LEISTUNGSDATEN

16.1 Analytische Sensitivität

Für den FAM- und Cy5-Kanal wurde die Nachweisgrenze (LoD) des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kit unter Verwendung serieller Verdünnungen der AcroMetrix MRSA Positivkontrolle, CE-IVD, bestimmt. Da in die AcroMetrix MRSA-Positivkontrolle, CE-IVD, keine ISC enthält, wurde die LoD für den ROX-Kanal mittels eines synthetischen DNA-Fragments, das die spezifische Zielsequenz enthält, bestimmt. Die Bestimmung des LoD erfolgte mit einem Stratagene Mx3005P.

Der LoD des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits beträgt $\leq 2,5$ Genomkopien pro μl für den FAM-, Cy5- und ROX-Kanal.

16.2 Analytische Spezifität

Die Spezifität des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kit wurde mit verschiedenen Ringversuchsproben mit bekanntem Status und verschiedenen anderen relevanten Viren und Bakterien, die in biologischen Proben gefunden wurden, und zusätzlich auf der Grundlage von in silico Analysen, überprüft.

Alle Ringversuchsproben wurden korrekt erkannt. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 und Tabelle 9 dargestellt.

Die Ergebnisse der Probenanalyse sind in Tabelle 10 und Tabelle 11 dargestellt. Die Ergebnisse für die In-silico-Analyse sind in Tabelle 12 dargestellt.

Tabelle 8: Ringversuchsproben, die zur Validierung der Empfindlichkeit des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits verwendet wurden. Ergebnisse für den FAM-Kanal.

Probe	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos, <i>spa:t 008</i>)	positiv	positiv
MRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	positiv	positiv
Escherichia coli K12	negativ	negativ
cMSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis oxaR</i> , PVL-pos)	negativ	negativ
CoNS (<i>S. epidermidis</i> , <i>oxaS</i>)	negativ	negativ
MSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , <i>S. hämolyticus oxaR</i> , PVL-neg)	negativ	negativ
MRSA SCCmec TypV (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	positiv	positiv
cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	positiv	positiv
MRSA (<i>S. aureus</i> , PVL-neg, pSA442 neg)	positiv	positiv

Probe	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
CoNS oxaS	negativ	negativ
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)</i>	positiv	positiv
cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)	positiv	positiv

Tabelle 9: Ringversuchsproben, die zur Validierung der Empfindlichkeit des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits verwendet wurden. Ergebnisse für den Cy5-Kanal.

Probe	erwartetes Ergebnis	Ergebnis
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos, spa:t 008)</i>	positiv	positiv
MRSA (S. aureus, oxaR, PVL-neg)	positiv	positiv
Escherichia coli K12	negativ	negativ
<i>cMSSA + CoNS (S. aureus, S. epidermidis oxaR, PVL-pos)</i>	positiv	positiv
<i>CoNS (S. epidermidis, oxaS)</i>	negativ	negativ
MSSA + CoNS (S. aureus, S. hämolyticus oxaR, PVL-neg)	positiv	positiv
MRSA SCCmec TypV (S. aureus, oxaR, PVL-neg)	positiv	positiv
cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)	positiv	positiv
MRSA (S. aureus, PVL-neg, pSA442 neg)	positiv	positiv
CoNS oxaS	negativ	negativ
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)</i>	positiv	positiv
cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)	negativ	negativ

Tabelle 10: Eluierte DNA/RNA von bakteriellen und viralen Krankheitserregern, die zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kit. Ergebnisse für den FAM-Kanal.

Probe	erwartetes Ergebnis FAM-Kanal	MutaPLEX® MRSA seqc FAM-Kanal
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negativ	negativ
Coxsackie Virus A9 Strain P.B.	negativ	negativ
Herpes simplex Virus Type 2 Str. G	negativ	negativ

Probe	erwartetes Ergebnis FAM-Kanal	MutaPLEX® MRSA seqc FAM-Kanal
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus ueberis</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus dysagalactiae</i>	negativ	negativ
<i>Enterococcus faecalis</i>	negativ	negativ
<i>Klebsiella</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus intermedius</i>	negativ	negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus sciuri</i>	negativ	negativ
<i>Legionella pneumophila</i>	negativ	negativ
TBE Virus K617	negativ	negativ
Influenza A Virus (H1N1)	negativ	negativ
Influenza B Virus	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus A	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus B	negativ	negativ
Cytomegalie Virus AD169	negativ	negativ

Tabelle 11: Eluierte DNA/RNA von bakteriellen und viralen Krankheitserregern, die zur Bestimmung der analytischen Spezifität des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kit. Ergebnisse für den Cy5-Kanal.

Probe	erwartetes Ergebnis Cy5-Kanal	MutaPLEX® MRSA seqc Cy5-Kanal
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negativ	negativ
Coxsackie Virus A9 Strain P.B.	negativ	negativ
Herpes simplex Virus Type 2 Str. G	negativ	negativ
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus ueberis</i>	negativ	negativ
<i>Streptococcus dysagalactiae</i>	negativ	negativ
<i>Enterococcus faecalis</i>	negativ	negativ

Probe	erwartetes Ergebnis Cy5-Kanal	MutaPLEX® MRSA seqc Cy5-Kanal
<i>Klebsiella</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus intermedius</i>	negativ	negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ	negativ
<i>Staphylococcus sciuri</i>	negativ	negativ
<i>Legionella pneumophila</i>	negativ	negativ
TBE Virus K617	negativ	negativ
Influenza A Virus (H1N1)	negativ	negativ
Influenza B Virus	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus A	negativ	negativ
Respiratory Syncytial Virus B	negativ	negativ
Cytomegalie Virus AD169	negativ	negativ

Tabelle 12: Einschussfähigkeit der MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit Primer und Sonden (in silico Analyse)

9 - 1000 vollständige Genomsequenzen		Homologie	Kommentar
SCCmec / orfX junction	forward Primer Mix	9 / 9 - 593 / 593	basierend auf verschiedenen SCCmec-Kassetten
	reverse Primer	1000 / 1000	nur orfX
	Sonde	1000 / 1000	nur orfX
mecA	forward Primer	789 / 789	
	reverse Primer	789 / 789	
	Sonde	789 / 789	
mecC	forward Primer	18 / 18	
	reverse Primer	18 / 18	
	Sonde	18 / 18	

9 - 1000 vollständige Genomsequenzen		Homologie	Kommentar
Succinate dehydrogenase	forward Primer	1000 / 1000	
	reverse Primer	1000 / 1000	
	Sonde	1000 / 1000	

16.3 Linearität

Der lineare Bereich des MutaPLEX® MRSA seqc Real-Time-PCR-Kits wurde bewertet durch Analyse logarithmischer Verdünnungsreihen von in vitro-Transkripten der Zielsequenzen.

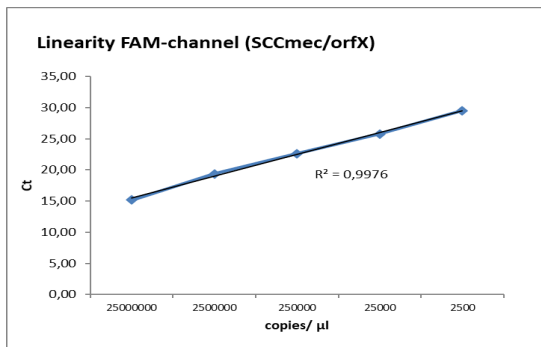


Abb. 5: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits für SCCmec im FAM-Kanal.

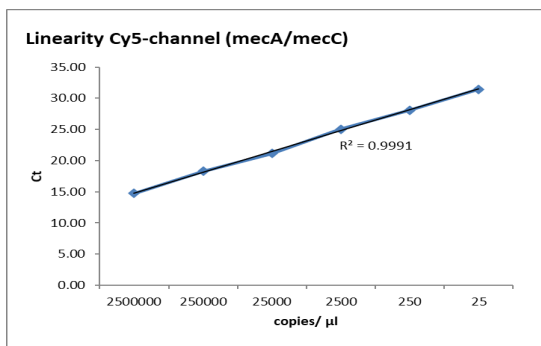


Abb. 6: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits für mecA/mecC im Cy5-Kanal.

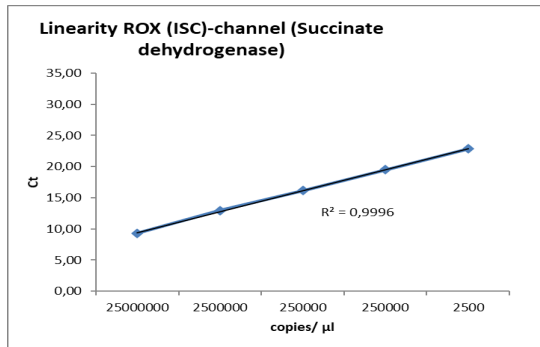


Abb. 7: Bestimmung des linearen Bereichs des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits für die ISC im ROX-Kanal.

16.4 Präzision

Die Präzision des MutaPLEX® MRSA seqc real-time-PCR-Kits wurde bestimmt als Intra-Assay-Variabilität, Inter-Assay-Variabilität und Inter-Lot-Variabilität. Die Variabilitätsdaten werden durch die Standardabweichung und den Variationskoeffizient ausgedrückt. Die Daten basieren auf Quantifizierungsanalysen von definierten Konzentrationen von SCCmec-spezifischer synthetischer DNA, mecA/mecC-spezifischer synthetischer DNA, ISC-spezifischer synthetischer DNA und auf dem *threshold cycle* der Kontroll-RNA (IPC). Die Ergebnisse sind in Tabelle 13 aufgeführt.

Tabelle 13: Präzision des MutaPLEX® MRSA seqc Real-Time-RT-PCR-Kits.

SCCmec (FAM)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	250	0,33	0,99
Inter-Assay-Variabilität	250	0,47	1,39
Inter-Lot-Variabilität	250	0,05	0,14

mecA/mecC (Cy5)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	25	0,25	0,78
Inter-Assay-Variabilität	25	0,23	0,72
Inter-Lot-Variabilität	25	0,17	0,52

ISC (ROX)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	2,5	0,22	0,69
Inter-Assay-Variabilität	2,5	0,20	0,62
Inter-Lot-Variabilität	2,5	0,22	0,67

IPC (HEX)	Kopien/ µl	Standard- abweichung	Variations- koeffizient [%]
Intra-Assay-Variabilität	250	0,34	1,20
Inter-Assay-Variabilität	250	0,85	2,96
Inter-Lot-Variabilität	250	0,26	0,91

16.5 Diagnostische Sensitivität und Spezifität

Die diagnostische Sensitivität von Real-Time (RT-) PCR-Tests hängt hauptsächlich von der DNA/RNA-Extraktionsmethode ab, die zur Isolierung von DNA und RNA aus verschiedenen biologischen Proben verwendet wurde. DNA/RNA-Extraktionsreagenzien sind nicht Teil 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 die 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 diagnostische Sensitivitäten in Handbüchern von Immundiagnostik AG Real-Time (RT-) PCR-Kits erwähnt werden, sind die Daten streng auf eine spezifische Nukleinsäureextraktionsmethode bezogen, die bei der Validierung der jeweiligen Kits verwendet wurde, und sind nicht auf andere Extraktionsmethoden übertragbar. Es liegt in der Verantwortung des Anwenders, die Extraktionsmethoden zu qualifizieren, die für die DNA/RNA-Isolierung aus biologischen Proben verwendet wurde.






17 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

MRSA

Methicillinresist-
enter *Staphylococ-
cus aureus*

REF

Katalognummer

MS-MRSA	Methicillinempfindliche MRSA, mecA Dropout-Mutante		Inhalt ausreichend für <n> Prüfungen
SCCmec/orfX	Verbindung von <i>S.-aureus</i> -DNA und SCCmec-Kassette		Obere Temperaturgrenze
MSSA	Methicillinempfindlicher <i>Staphylococcus aureus</i>		Hersteller
MR-ConS	Methicillinresistenter, Coagulase-negativer <i>Staphylococcus</i>		Verwendbar bis
mecA / mecC	Zwei Varianten des Methicillinresistenzgens	LOT	Chargennummer
DNA	Deoxyribonucleid Acid	CONTENT	Inhalt
PCR	Polymerase-Kettenreaktion		Arbeitsanleitung beachten
REACTION MIX	Reaktionsmix	IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
CONTROL +	Positivkontrolle	CE	Europäische Konformität
CONTROL -	Negativkontrolle	CONTROL DNA IPC	Kontroll-DNA (IPC)

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.

MutaPLEX[®] MRSA seqc real time PCR kit

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

Valid from 2021-10-15

REF **KG194196**



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

Table of Contents

1	INTENDED USE	24
2	PATHOGEN INFORMATION	24
3	PRINCIPLE OF THE TEST	24
4	PACKAGE CONTENTS	25
5	EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER	25
6	TRANSPORT, STORAGE AND STABILITY	25
7	WARNINGS AND PRECAUTIONS	26
8	SAMPLE MATERIAL	27
9	SAMPLE PREPARATION	27
10	CONTROL DNA	27
11	REAL TIME PCR	27
	11.1 <i>Important points before starting</i>	27
	11.2 <i>Procedure</i>	28
	11.3 <i>Instrument settings</i>	29
12	DATA ANALYSIS	31
13	ASSAY VALIDATION	33
14	LIMITATIONS OF THE METHOD	34
15	TROUBLESHOOTING	35
16	KIT PERFORMANCE	36
	16.1 <i>Analytical Sensitivity</i>	36
	16.2 <i>Analytical Specificity</i>	37
	16.3 <i>Linear Range</i>	40
	16.4 <i>Precision</i>	41
	16.5 <i>Diagnostic Sensitivity</i>	42
17	ABBREVIATIONS AND SYMBOLS	43
18.	LITERATURE	44

1 INTENDED USE

The MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR is an assay for the detection of DNA of MRSA extracted from biological specimens.

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 seqc real time PCR kit contains specific primers and dual-labelled probes for the amplification and detection of MRSA DNA extracted from biological specimen. The PCR targets the SCCmec/orfX junction and allows for the detection of MRSA in biological samples, even those containing coagulase-negative *Staphylococci*. Furthermore, MutaPLEX® MRSA seqc 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 seqc 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 HEX-labelled probe.

The Control DNA allows the detection of PCR inhibition and acts as control, that the nucleic acid was isolated from the biological specimen.

Additionally, MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit contains an Internal System Control (ISC). The ISC consists of primers and probes for the detection of a house

keeping gene (Succinate dehydrogenase) in the eluate from biological specimens. The ISC helps preventing false negative results due to insufficient sample drawing or transport. The amplification of the succinate dehydrogenase target sequence is measured in the ROX channel.

4 PACKAGE CONTENTS

The reagents supplied are sufficient for 96 reactions.

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

Label	Lid Colour	Content
		96
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 EQUIPMENT AND REAGENTS TO BE SUPPLIED BY USER

- DNA isolation kit (e.g. MutaCLEAN® Mag RNA/DNA, KG1023/KG1024)
- 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 or optical PCR reaction plate with optical foil
- Optional: Liquid handling system for automation

* 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 seqc 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:
- 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 pipette 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 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 acid and will bear the risk to contaminate the laboratory area.

- Discard sample and assay waste according to your local safety regulations.
- Do not combine kit components of different lot numbers.

8 SAMPLE MATERIAL

Starting material for the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR is bacterial DNA isolated from biological specimens.

9 SAMPLE PREPARATION

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

Commercial kits for DNA isolation such as MutaCLEAN® Mag RNA/DNA (KG1023/KG1024) 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 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 is supplied and can be used 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 buffer of the extraction kit.

11 REAL TIME PCR

11.1 *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.

11.2 Procedure

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.

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 / 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 / the optical PCR reaction plate (table 3).
- Close the optical PCR reaction tubes / the optical PCR reaction plate immediately after filling in order to reduce the risk of contamination.

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 one of the thermal profiles shown in table 4 and table 5.

Table 4: real time PCR thermal profile

Description	Time	Temperature	No of cycles
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		

If in the same run samples should be tested for pathogens with RNA genome, 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	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	465-510 533-580 533-610 618-660	Colour 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	3
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	FAM HEX ROX Cy5	Gain 8 Gain 1 Gain 1 Gain 4	Reference dye: none	
QuantStudio 5 Bio-Rad CFX96 Bio-Rad CFX Opus 96	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	FAM HEX ROX Cy5	Option reference dye ROX: NO		
Mic qPCR Cycler	SCCmec/orfX Control DNA (IPC) ISC mecA/mecC Mutation/Deletion	Green Yellow Red Orange	Gain 8 Gain 10 Gain 10 Gain 10		

12 DATA ANALYSIS

The following results can occur:

Signal/ C _T Values				Interpretation
FAM Channel SCCmec/orfX	Cy5 Channel resistance gene mecA/mecC	ROX Channel ISC	HEX Channel IPC	
positive	positive	positive or negative ¹	positive or negative ²	Positive result, the sample contains MRSA DNA.
positive	negative	positive or negative ¹	positive or negative ²	Negative result, the sample contains MS-MRSA DNA.
negative	positive	positive or negative ¹	positive or negative ²	Negative result, the sample contains MR-CoNS DNA.
negative	negative	positive	≤ 34 ³	Negative result, the sample contains no MRSA/ MS-MRSA and MR-CoNS DNA.
negative	negative	negative	negative oder > 34 ³	No diagnostic statement can be made. The real time PCR is either inhibited or errors occurred while DNA extraction.

¹ If the analysed samples originate from cultivation, the ROX channel may be negative.

² A strong positive signal in the FAM or the Cy5 can inhibit the IPC. In such cases the result for the Control DNA can be neglected.

³ In case of high C_T values, the IPC should be compared to the water extraction control as described in the chapter 'Assay Validation'.

Figures 1 - 4 show examples for positive and negative real time PCR results.

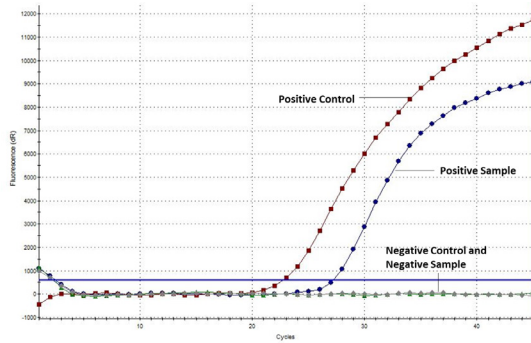


Fig. 1: The Positive Sample shows pathogen specific amplification in the FAM channel (Positive Sample and Positive Control), whereas no fluorescence signal is detected in the Negative Sample or the Negative Control (Mx3005P).

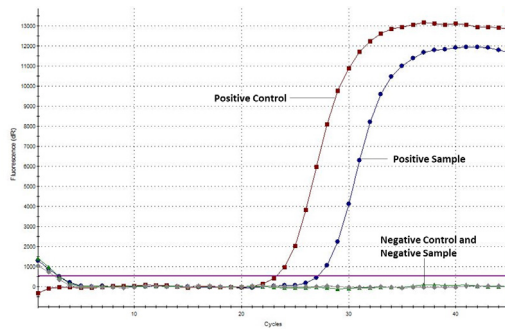


Fig. 2: The Positive Sample shows pathogen specific amplification in the Cy5 channel (Positive Sample and Positive Control), whereas no fluorescence signal is detected in the Negative Sample or the Negative Control (Mx3005P).

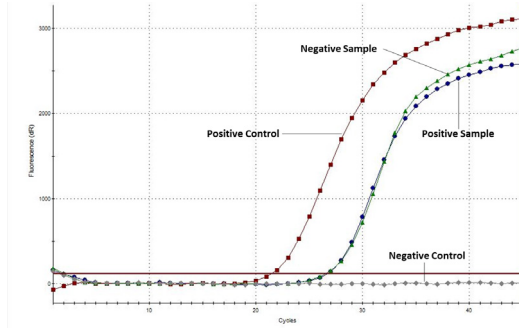


Fig. 3: Signals of the amplification of the ISC in the ROX channel. The amplification signal in the positive and the negative sample indicates a sufficient amount of DNA in the sample eluate and confirms the integrity of the sampling (Mx3005P).

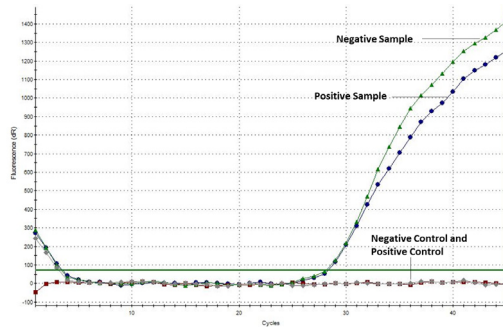


Fig. 4: The Positive Sample and the Negative Sample show a signal in the Control DNA specific HEX channel (IPC). The amplification signal of the Control DNA in the Negative Sample shows that the missing signals in the pathogen specific channels FAM and Cy5 are not due to PCR inhibition or failure of DNA isolation, but that the sample is a true Negative Sample (Mx3005P).

13 ASSAY VALIDATION

Negative controls

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

Positive controls

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

Internal controls

The following values for the amplification of the internal controls are valid using the nucleic acid extraction kit MutaCLEAN® Mag RNA/DNA. All internal controls (ISC and IPC, seqc – sample and extraction quality control) must show a positive (i.e. exponential) amplification curve.

The Control DNA (IPC) must fall below a C_T of 34. If the Control DNA is 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.

For accurately drawn respiratory swab samples, the ISC shows C_T values from app. 15 to app. 28. A heavily delayed signal of higher than a C_T of 34 indicates a low sample amount. Therefore, false negative results cannot be ruled out. In case of no amplifications neither in the FAM nor in the Cy5 channel, there must be an amplification curve in the ROX channel (ISC) and the HEX (IPC) channel when using eluates of primary samples from humans.

If other nucleic acid extraction kits are used, the customer 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 Instruction 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 diarellaMRSA seqc 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 FAM, Cy5, ROX 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, the ROX channel for the amplification of the ISC and the HEX channel for the amplification of the Control DNA (IPC).

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 (tables 4 and 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 (IPC) and ISC 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 11).

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.

Detection of a fluorescence signal in the ROX channel of the Negative Control***Contamination with human DNA during preparation of the real time PCR***

As long as the ROX channel shows very high C_T values, the contamination is negligible.

If the FAM and Cy5 channel are negative in the Negative Control, the PCR is still valid for the detection of MRSA.

16 KIT PERFORMANCE**16.1 Analytical Sensitivity**

For the FAM and Cy5 channel the limit of detection (LoD) of MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit was determined using serial dilutions of the AcroMetrix MRSA Positive Control, CE-IVD. Since there is no ISC within the AcroMetrix MRSA Positive Control, CE-IVD, the LoD for the ROX channel was determined using serial dilutions of a synthetic DNA-fragment containing the specific gene target sequence. The determination of the LoD was done on a Stratagene Mx3005P.

The LoD of MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit is < 2.5 genome copies per µl for the FAM, Cy5 and ROX channel.

16.2 Analytical Specificity

The specificity of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR 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 were detected correctly. Results are shown in table 8 and table 9.

The results for the sample analysis are shown table 10 and table 11. The results for the in silico analysis are shown in table 12

Table 8: Ring trial samples tested for the validation of the sensitivity of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit. Results for the FAM channel.

sample	expected result	result
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos, spa:t 008)</i>	positive	positive
MRSA (<i>S. aureus, oxaR, PVL-neg</i>)	positive	positive
Escherichia coli K12	negative	negative
<i>cMSSA + CoNS (S. aureus, S. epidermidis oxaR, PVL-pos)</i>	negative	negative
<i>CoNS (S. epidermidis, oxaS)</i>	negative	negative
MSSA + CoNS (<i>S. aureus, S. hämolyticus oxaR, PVL-neg</i>)	negative	negative
MRSA SCCmec TypV (<i>S. aureus, oxaR, PVL-neg</i>)	positive	positive
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)</i>	positive	positive
MRSA (<i>S. aureus, PVL-neg, pSA442 neg</i>)	positive	positive
CoNS <i>oxaS</i>	negative	negative
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)</i>	positive	positive
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos)</i>	positive	positive

Table 9: Ring trial samples tested for the validation of the sensitivity of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit. Results for the Cy5 channel.

sample	expected result	result
<i>cMRSA (S. aureus, oxaR, PVL-pos, spa:t 008)</i>	positive	positive
MRSA (<i>S. aureus, oxaR, PVL-neg</i>)	positive	positive

sample	expected result	result
Escherichia coli K12	negative	negative
cMSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis oxaR</i> , PVL-pos)	positive	positive
CoNS (<i>S. epidermidis</i> , <i>oxaS</i>)	negative	negative
MSSA + CoNS (<i>S. aureus</i> , <i>S. hämolyticus oxaR</i> , PVL-neg)	positive	positive
MRSA SCCmec TypV (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-neg)	positive	positive
cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	positive	positive
MRSA (<i>S. aureus</i> , PVL-neg, pSA442 neg)	positive	positive
CoNS <i>oxaS</i>	negative	negative
cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	positive	positive
cMRSA (<i>S. aureus</i> , <i>oxaR</i> , PVL-pos)	negative	negative

Tabelle 10: Eluted DNA/RNA from bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit, FAM channel.

sample	expected result FAM channel	MutaPLEX® MRSA seqc FAM channel
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negative	negative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negative	negative
Coxsackie A9 Strain P.B.	negative	negative
Herpes simplex Virus Type 2 Str. G	negative	negative
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negative	negative
<i>Staphylococcus ueberis</i>	negative	negative
<i>Streptococcus dysagalactiae</i>	negative	negative
<i>Entrococcus faecalis</i>	negative	negative
<i>Klebsiella</i>	negative	negative
<i>Staphylococcus intermedius</i>	negative	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative	negative
<i>Staphylococcus sciuri</i>	negative	negative
<i>Legionella pneumophila</i>	negative	negative
TBE Virus K617	negative	negative

sample	expected result FAM channel	MutaPLEX® MRSA seqc FAM channel
Influenza A Virus (H1N1)	negative	negative
Influenza B Virus	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus A	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus B	negative	negative
Cytomegalie Virus AD169	negative	negative

Tabelle 11: Eluted DNA/RNA from bacterial and viral pathogens tested for the determination of the analytical specificity of MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit, Cy5 channel.

sample	expected result Cy5 channel	MutaPLEX® MRSA seqc Cy5 channel
<i>Pneumocystis jirovecii</i>	negative	negative
<i>Streptococcus agalactiae</i>	negative	negative
Coxsackie A9 Strain P.B.	negative	negative
Herpes simplex Virus Type 2 Str. G	negative	negative
<i>Borrelia burgdorferi</i>	negative	negative
<i>Staphylococcus ueberis</i>	negative	negative
<i>Streptococcus dysagalactiae</i>	negative	negative
<i>Entrococcus faecalis</i>	negative	negative
<i>Klebsiella</i>	negative	negative
<i>Staphylococcus intermedius</i>	negative	negative
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negative	negative
<i>Staphylococcus sciuri</i>	negative	negative
<i>Legionela pneumophila</i>	negative	negative
TBE Virus K617	negative	negative
Influenza A Virus (H1N1)	negative	negative
Influenza B Virus	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus A	negative	negative
Respiratory Syncytial Virus B	negative	negative
Cytomegalie Virus AD169	negative	negative

Tabelle 12: Inclusivity of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit Primers and Probes (in silico analysis).

9 - 1000 whole genome sequences		Homology	Comment
SCCmec / orfX junction	forward Primer Mix	9 / 9 - 593 / 593	based on different SCCmec cassettes
	reverse Primer	1000 / 1000	only orfX
	Probe	1000 / 1000	only orfX
mec A	forward Primer	789 / 789	
	reverse Primer	789 / 789	
	Probe	789 / 789	
mec C	forward Primer	18 / 18	
	reverse Primer	18 / 18	
	Probe	18 / 18	
Succinate dehydrogebase	forward Primer	1000 / 1000	
	reverse Primer	1000 / 1000	
	Probe	1000 / 1000	

16.3 Linear Range

The linear range of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit was evaluated by analysing logarithmic dilution series of in vitro transcripts of the target sequences.

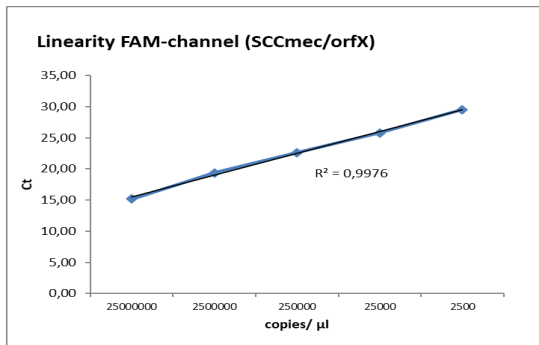


Fig. 5: Determination of the linear range of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit for SCCmec in the FAM channel.

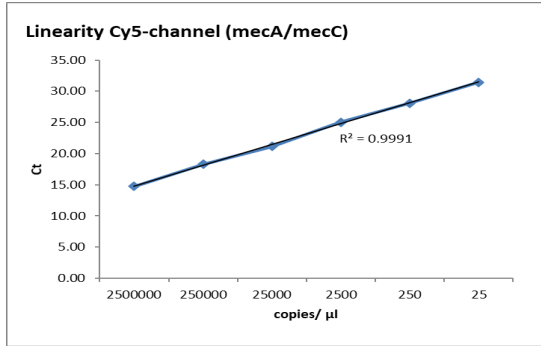


Abb. 6: Determination of the linear range of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit for mecA/mecC in the Cy5 channel.

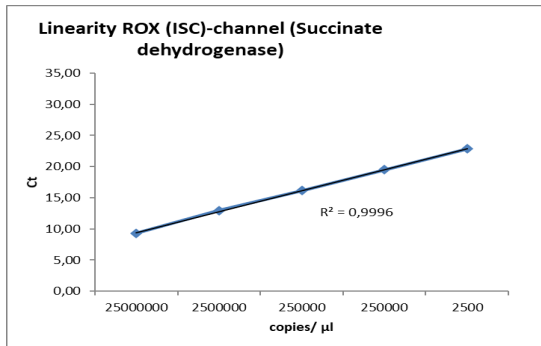


Abb. 7: Determination of the linear range of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit for the ISC in the ROX channel.

16.4 Precision

The precision of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit 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 SCCmec specific synthetic DNA, mecA/mecC specific synthetic DNA, ISC specific synthetic DNA and on the threshold cycle of the Control RNA (IPC). The results are shown in Table 13.

Table 13: Precision of the MutaPLEX® MRSA seqc real time PCR Kit.

SCCmec (FAM)	copies/ µl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay-Variability	250	0.33	0.99

SCCmec (FAM)	copies/ µl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Inter-Assay-Variability	250	0.47	1.39
Inter-Lot-Variability	250	0.05	0.14

mecA/mecC (Cy5)	copies/ µl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay-Variability	25	0.25	0.78
Inter-Assay-Variability	25	0.23	0.72
Inter-Lot-Variability	25	0.17	0.52

ISC (ROX)	copies/ µl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay-Variability	2.5	0.22	0.69
Inter-Assay-Variability	2.5	0.20	0.62
Inter-Lot-Variability	2.5	0.22	0.67

IPC (HEX)	copies/ µl	Standard Deviation	Coefficient of Variation [%]
Intra-Assay-Variability	250	0.34	1.20
Inter-Assay-Variability	250	0.85	2.96
Inter-Lot-Variability	250	0.26	0.91









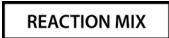




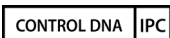
16.5 Diagnostic Sensitivity

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 manuals 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
MS-MRSA	Methicillin-susceptible MRSA, <i>mecA</i> dropout mutant		Contains sufficient for <n> test
SCCmec/orfX	Junction for <i>S. aureus</i> DNA and SCCmec cassette		Upper limit of temperature
MSSA	Methicillin-susceptible <i>Staphylococcus aureus</i>		Manufacturer
MR-ConS	Methicillin-resistant coagulase negative <i>Staphylococcus</i>		Use by YYYY-MM-DD
<i>mecA</i> / <i>mecC</i>	Two variants of the methicillin resistance gene		Batch code
DNA	Deoxyribonucleic Acid		Content
PCR	Polymerase Chain Reaction		Consult instructions for use
	Reaktion Mix		<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Positive Control		European Conformity
	Negative Control		Control DNA (IPC)

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.

Immundiagnostik AG

Stubenwald-Allee 8a
64625 Bensheim, Germany

Tel.: +49 6251 70190-0

Fax: +49 6251 70190-363

info@immundiagnostik.com

www.immundiagnostik.com

