

## RIDA® GENE MRSA

**REF** PG0605



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, 64297 Darmstadt, Deutschland

+49 (0) 61 51 81 02-0 / +49 (0) 61 51 81 02-20 / [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com)



## 1. Zweckbestimmung

Für die *in-vitro* Diagnostik. Der RIDA®GENE MRSA Test, der auf dem Roche LightCycler® 480 II durchgeführt wird, ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis von Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus* (MSSA) DNA aus unbehandelten humanen Nasen-/ Rachen- und Wundabstrichen und Kultur von asymptomatischen Personen und Personen mit Anzeichen und Symptomen einer MRSA-verursachten Infektion.

Der RIDA®GENE MRSA Test ist zur Unterstützung der Diagnose von Staphylococcus-Infektionen (Meth. res. *Staphylococcus aureus* (MRSA), Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA)) bei asymptomatischen Personen und Patienten mit Symptomen einer MRSA-verursachten Infektion in Verbindung mit anderen klinischen Befunden und Laborbefunden vorgesehen.

Negative Ergebnisse schließen eine Staphylococcus-Infektion (Meth. res. *Staphylococcus aureus* (MRSA), Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA)) nicht aus und sollten nicht als alleinige Grundlage für die Diagnose herangezogen werden.

Das Produkt ist für die professionelle Anwendung vorgesehen.

## 2. Zusammenfassung und Erklärung des Tests

Staphylokokken sind als natürliche Besiedler der Haut sowie der Schleimhäute des Mundrachens beim Menschen und bei Tieren weit verbreitet. Sie werden in Koagulase-positive (*S. aureus*) und Koagulase-negative Staphylokokken (z.B. *S. epidermidis*) unterteilt. *Staphylococcus aureus* ist einer der bedeutendsten Erreger von nosokomialen Infektionen in Krankenhäusern und sonstigen Einrichtungen des Gesundheitswesens.<sup>1,2</sup> Die Übertragung des Erregers erfolgt über das medizinische Personal oder durch andere Patienten. Schätzungsweise 30% der gesunden Bevölkerung ist mit *S. aureus* kolonisiert (asymptomatische Träger). Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist einer der häufigsten Erreger von nosokomialen Infektionen weltweit (hospital-acquired MRSA oder auch HA-MRSA genannt). Neben den HA-MRSA-Infektionen gibt es auch community-acquired MRSA (CA-MRSA)-Infektionen, die außerhalb des Krankenhauses erworben werden.<sup>3,4</sup> In den letzten Jahren treten auch mit der Tiermast, besonders bei Schweinehaltern, assoziierte MRSA-Infektionen (livestock-associated MRSA oder auch LA-MRSA) auf.<sup>5,6</sup> Die Methicillin (Oxacillin)-Resistenz von *S. aureus* wird durch das Penicillin-bindende Protein PBP2a vermittelt, welches durch das chromosomale *mecA*-Gen kodiert wird. Das *mecA*-Gen ist auf der variablen und instabilen SCC*mec*-Genkassette (Staphylococcal cassette chromosome *mec*) lokalisiert. Bisher wurden 14 SCC*mec*-Kassettentypen beschrieben, von denen die Typen I bis V am häufigsten vorkommen.<sup>3,7,8</sup>

Der SCCmec Kassettyp XI (SCCmec XI), der ein weiteres *mecA*-Homolog (auch als *mecC* oder *meCLGA251* bezeichnet) enthält, wurde erstmals 2011 beschrieben. Das *mecC*-Gen weist nur eine Nukleotidhomologie von 70% mit *mecA* auf und ist mit üblichen *mecA*-spezifischen PCRs und PBP2a-Agglutinationstests nicht nachweisbar. Es wurde in *S. aureus* Isolaten von Menschen und Rindern beschrieben.<sup>9</sup>

MRSA-Infektionen sind im Gegensatz zu Infektionen mit MSSA (Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus*), mit einer erhöhten Morbidität, Mortalität, verlängertem Krankenhausaufenthalt und erhöhten Behandlungskosten assoziiert.<sup>10,11</sup>

Risikofaktoren für eine MRSA-Infektion in Einrichtungen des Gesundheitswesens sind Kontakt zu Patienten mit MRSA-Infektion, bekannte MRSA-Anamnese, Länge des Krankenhausaufenthaltes und eine lang anhaltende antibiotische Therapie.<sup>12</sup>

Jede MRSA-Infektion verursacht bis zu 10.000 \$ zusätzliche Kosten.<sup>13</sup> In der Europäischen Union erkranken jedes Jahr mehr als 150.000 Krankenhauspatienten an einer MRSA-Infektion. Die daraus resultierenden Krankenhauskosten für das europäische Gesundheitssystem werden auf 380 Millionen Euro geschätzt.<sup>14</sup>

Ein frühzeitiges, schnelles und systematisches MRSA-Screening ermöglicht die spezifische Behandlung infizierter Patienten und die Einleitung der entsprechenden Hygienemaßnahmen, um eine MRSA-Übertragung und Ausbreitung zu verhindern. Bei der Verwendung von konventionellen Kulturmethoden zum Nachweis von MRSA werden 48 – 72 Stunden benötigt. Real-time PCR Tests ermöglichen ein frühzeitiges und schnelles MRSA-Screening am Tag der Einweisung in ein Krankenhaus als Teil des Infektions-Präventionsprogramms („search and destroy“-Strategie).<sup>15</sup>

### 3. Testprinzip

RIDA®GENE MRSA ist eine multiplex real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung von Methicillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (MRSA) und Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA) aus humanen Nasen- und Nasen/Rachenabstrichen, Kulturproben. Nach der DNA-Isolierung werden (falls vorhanden) die spezifischen Genfragmente von MRSA (*mecA*- / *mecC*-Gen, die SCCmec / *orfX* junction und das SA442-Gen) amplifiziert. Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit einem Quencher und am anderen Ende mit einem Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (Fluorophor) markiert sind, nachgewiesen. In Gegenwart einer Zielsequenz hybridisieren die Sonden mit den Amplikons. Während der Extension trennt die Taq-Polymerase den Reporter vom Quencher. Der Reporter emittiert ein Fluoreszenzsignal, das durch die optische Einheit eines real-time PCR-Gerätes detektiert wird. Das Fluoreszenzsignal steigt mit der Menge der gebildeten Amplikons an. Der RIDA®GENE MRSA Test enthält eine Internal Control DNA (ICD), um die Probenpräparation und/oder eine potentielle PCR-Inhibition kontrollieren zu können.

#### 4. Packungsinhalt

**Tab. 1:** Packungsinhalt (Die Reagenzien einer Packung reichen für 100 Bestimmungen)

Kit Code	Reagenz	Menge		Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2x	1100 µl	gelb
2	Taq-Polymerase	1x	11 µl	rot
D	Internal Control DNA	2x	1800 µl	braun
L	Lysis Buffer 1	2x	12 ml	farblos
N	PCR Water	1x	500 µl	weiß
P	Positive Control	1x	200 µl	blau

#### 5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können ungeöffnet bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien schonend aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 15 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaft nicht (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

## 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

Der RIDA®GENE MRSA multiplex real-time PCR Test ist geeignet für die Verwendung mit folgenden real-time PCR-Geräten:

**Tab. 2:** Benötigtes Zubehör

Real-time PCR-Geräte	
Roche	LightCycler® 480II
Agilent Technologies	Mx3005P
Applied Biosystems	ABI 7500
Bio-Rad	CFX96™

Sollten Sie weitere real-time PCR-Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte die R-Biopharm AG zur Überprüfung der Kompatibilität unter [pcr@r-biopharm.de](mailto:pcr@r-biopharm.de).

- Sterile Abstrichtupfer (z.B. eSwab®, Copan Diagnostic Inc.)
- RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) bei Verwendung des LightCycler® 480II
- Real-time PCR-Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
- Vortexer
- Heizschüttler
- Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
- Pipettenspitzen mit Filtern
- Puderfreie Einmalhandschuhe
- PCR-Wasser (Nuklease-frei)

## 7. Vorsichtsmaßnahmen

- Dieser Test ist nur von geschultem Laborpersonal durchzuführen. Die Richtlinien zur Arbeit in medizinischen Laboratorien sind zu beachten.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Proben oder Reagenzien nicht mit dem Mund pipettieren. Kontakt mit verletzter Haut oder Schleimhäuten vermeiden.
- Während des Umgangs mit Reagenzien und Proben, persönliche Schutzausrüstung (geeignetes Handschuhmaterial, Kittel, Schutzbrille) tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Klinische Proben müssen als potentiell infektiös angesehen werden und müssen wie sämtliche Reagenzien und Materialien, die mit potentiell infektiösen Proben zusammenkommen entsprechend entsorgt werden.
- Testkit nach Erreichen des Verfallsdatums nicht mehr verwenden.
- Alle Reagenzien und Materialien müssen nach Gebrauch sachgerecht und eigenverantwortlich entsorgt werden. Bitte beachten Sie bei der Entsorgung die jeweils national geltenden Vorschriften.

Weitere Details siehe Safety Data Sheets (SDS) unter [www.r-biopharm.com](http://www.r-biopharm.com).

## 8. Sammlung und Lagerung der Proben

### 8.1 DNA-Präparation aus Abstrichen

Für die DNA-Isolierung aus Abstrichen wird folgende Isolierungsmethode empfohlen: In ein Präparationsröhrchen 200 µl Lysis Buffer 1 geben. Den Abstrichtupfer in den vorgelegten Lysis Buffer 1 eintauchen und den Stab abbrechen oder abschneiden. Bei Verwendung von Abstrichtupfern mit Medium können 100µl des Swab-Mediums zu den 200µl Lysispuffer gegeben und weiter behandelt werden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 Sekunden stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 Minuten bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend bei 13.000 x g 1 min zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

**Hinweis:** Bei starker Trübung den Zentrifugationsschritt ggf. wiederholen.

Der RIDA®GENE MRSA Test enthält eine Internal Control DNA, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die Internal Control DNA kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die Internal Control DNA nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der Internal Control DNA je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** je Probe während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 8.2 DNA-Präparation aus Kulturproben

Für die DNA-Isolierung aus Kulturproben wird folgende Isolierungsmethode empfohlen: In ein Präparationsröhrchen 200 µl Lysis Buffer 1 geben. Mit einer Impföse mehrere Kolonien sammeln und in den vorgelegten Lysis Buffer 1 suspendieren. Den Stab der Impföse abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 Sekunden stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 Minuten bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend bei 13.000 x g 1 min zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

**Hinweis:** Bei starker Trübung den Zentrifugationsschritt ggf. wiederholen.

Der RIDA®GENE MRSA Test enthält eine **Internal Control DNA**, die eine mögliche PCR-Inhibition anzeigt, die Integrität der Reagenzien überprüft und eine erfolgreiche Nukleinsäureextraktion bestätigt. Die **Internal Control DNA** kann entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle verwendet werden.

Wird die **Internal Control DNA** nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der **Internal Control DNA** je Reaktion dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 4).

Wird die **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der **Internal Control DNA** je Probe während der Extraktion eingesetzt werden. Die **Internal Control DNA** soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden. Wir empfehlen je 1 µl pro Reaktion der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle und der Positivkontrolle zu pipettieren.

## 9. Testdurchführung

### 9.1 Herstellung des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Bei jedem Testlauf muss eine Positivkontrolle und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

Es wird empfohlen den Master-Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen (s. Tab. 3, Tab. 4). Vor der Benutzung den **Reaction Mix**, die **Taq-Polymerase**, die **Positive Control**, das **PCR Water** und die **Internal Control DNA** auftauen, durchmischen und kurz zentrifugieren. Reagenzien während der Arbeitsschritte stets geeignet kühlen (2 - 8 °C).

**Tab. 3:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.

**Tab. 4:** Beispiel für die Berechnung und Herstellung des Master-Mix für 10 Reaktionen (ICD nur als Inhibitionskontrolle)

Kit Code	Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10 %)
1	Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
2	Taq-Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
D	Internal Control DNA	1,0 µl	11 µl
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.



## 9.2 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße (Gefäße/Platten) pipettieren.

**Negativkontrolle:** 5 µl **PCR Water** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Negativkontrolle zu pipettieren.

**Proben:** 5 µl Eluat zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Positivkontrolle:** 5 µl **Positive Control** zum vorgelegten Master-Mix pipettieren.

**Hinweis:** Wir empfehlen bei Verwendung der **Internal Control DNA** als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und als Inhibitionskontrolle 1 µl der **Internal Control DNA** zum PCR-Mix der Positivkontrolle zu pipettieren.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz zentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 5, Tab. 6)

## 9.3 Geräteeinstellungen

### 9.3.1 DNA real-time PCR Profil

**Tab. 5:** DNA real-time PCR Profil für LightCycler® 480II

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	10 sec, 95 °C
Annealing/Extension	15 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

**Tab. 6:** DNA real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI 7500, und CFX96™

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
<u>PCR</u> Denaturierung	15 sec, 95 °C
Annealing/Extension	30 sec, 60 °C
Temperature Transition Rate / Ramp Rate	Maximum

**Hinweis:** Das Annealing und die Extension finden im selben Schritt statt.

#### 9.4 Detektionskanaleinstellung

**Tab. 7:** Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR-Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	SCCmec / orfX junction	465/510	<b>RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt</b>
	ICD	533/580	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	533/610	
	mecA / mecC	618/660	
<b>Agilent Technologies Mx3005P</b>	SCCmec / orfX junction	FAM	<b>Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none</b>
	ICD	HEX	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
<b>ABI 7500</b>	SCCmec / orfX junction	FAM	<b>Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none</b>
	ICD	VIC	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
<b>Bio-Rad CFX96™</b>	SCCmec / orfX junction	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	

## 10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativkontrolle und Positivkontrolle müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 8, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die **Positive Control** liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien/ $\mu$ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR-Lauf eingesetzt.

**Tab. 8:** Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

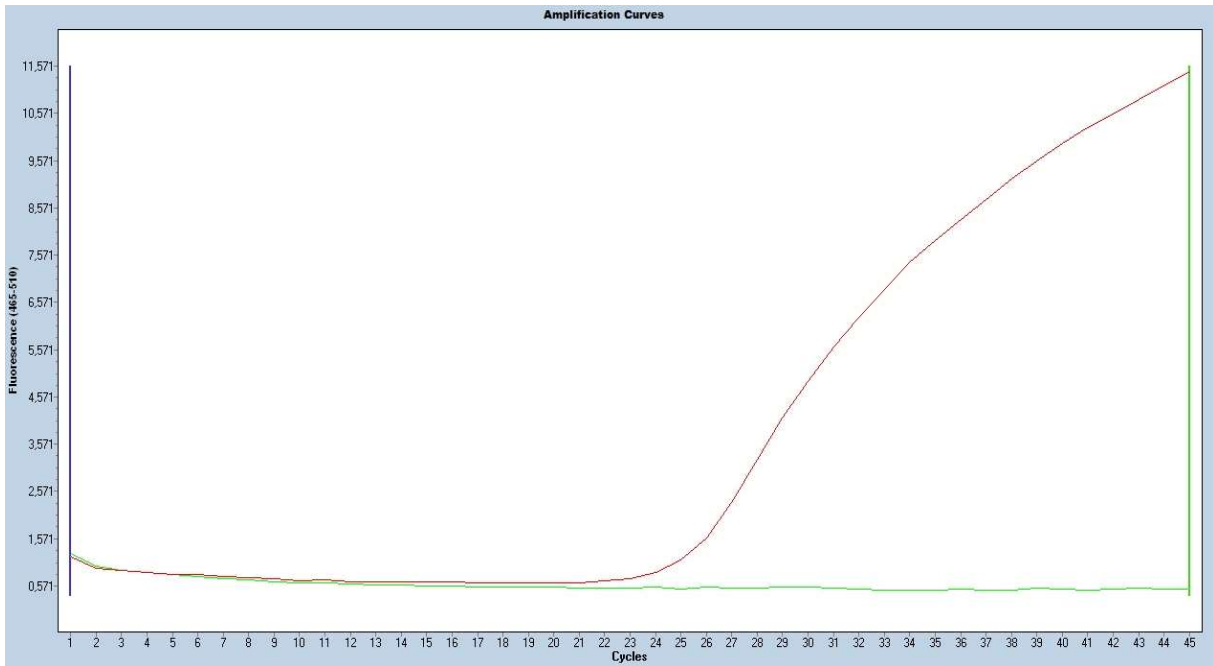
Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
Positivkontrolle	Positiv	NA * <sup>1</sup>	Siehe Certificate of Analysis
Negativkontrolle	Negativ	Ct > 20	Nicht nachweisbar

\*<sup>1</sup> Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

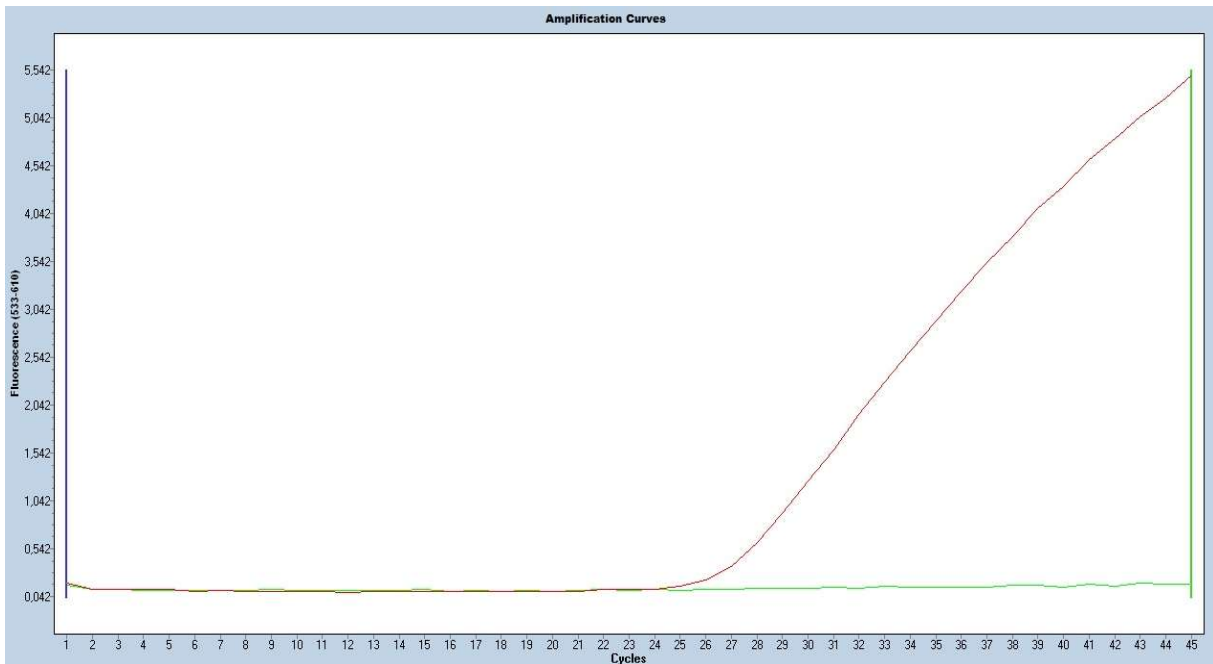
Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle sind valide, wenn sie den in der Tabelle angegebenen Bedingungen entsprechen. Der Ct-Bereich für die Positivkontrolle ist auf dem Produkt beigelegten Quality Assurance Certificate angegeben. Sollte eine der beiden Kontrollen nicht die Bedingungen für einen validen Lauf erfüllen, müssen alle Reaktionen inklusive der Kontrollen neu angesetzt werden.

Sollten die vorgegebenen Werte nicht erfüllt sein, ist vor einer Testwiederholung Folgendes zu überprüfen:

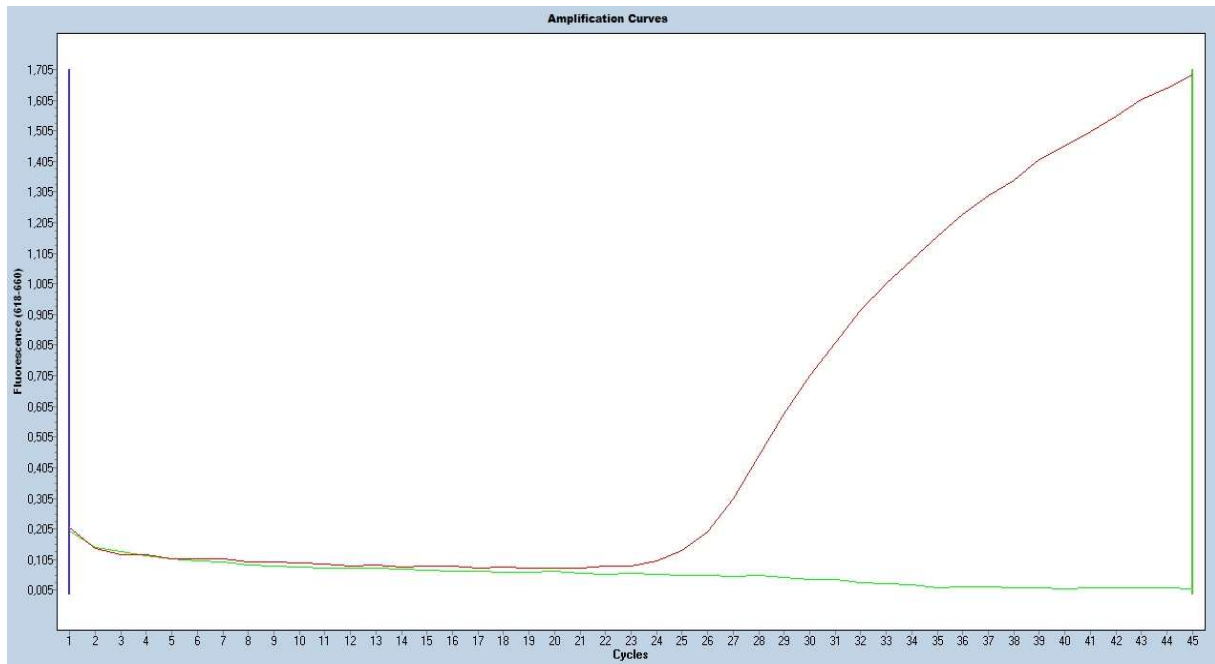
- Haltbarkeit der verwendeten Reagenzien
- Funktionsfähigkeit der eingesetzten Geräte
- Korrekte Testdurchführung



**Abb. 1:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (SCCmec / orfX junction) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 2:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (SA442 (*S.aureus*)) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 3:** Korrekter Verlauf der Positivkontrolle (rot) und Negativkontrolle (grün) (mecA / mecC) auf dem LightCycler® 480II

## 11. Interpretation der Ergebnisse

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 9.

**Tab. 9:** Interpretation der Ergebnisse

Nachweis von			ICD	Ergebnis
SCCmec / orfX junction	SA442 ( <i>S.aureus</i> )	mecA / mecC		
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	<b>MRSA* nachweisbar (siehe Grenzen der Methode Punkt 8)</b>
positiv	positiv	negativ	positiv/negativ	<b>MRSA nicht nachweisbar; MSSA** nachweisbar (siehe Grenzen der Methode Punkt 7)</b>
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	<b>MSSA nachweisbar</b>
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	<b>MRSA nicht nachweisbar (siehe Grenzen der Methode Punkt 9)</b>
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	<b>MRSA nicht nachweisbar; MSSA nachweisbar (siehe Grenzen der Methode Punkt 8)</b>
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	<b>MRSA nicht nachweisbar (Siehe Grenzen der Methode Punkt 7)</b>
negativ	negativ	negativ	positiv	<b>Zielgene nicht nachweisbar</b>
negativ	negativ	negativ	negativ	<b>Ungültig</b>
positiv	negativ	negativ	positiv/negativ	<b>Weder MRSA noch MSSA nachweisbar (siehe Grenzen der Methode Punkt 7)</b>

\* MRSA = Methicillin-resistenter *S. aureus*

\*\* MSSA = Methicillin-sensibler *S. aureus*

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA eine Amplifikation im Nachweissystem zeigen.

Eine Probe wird ebenfalls positiv bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch keine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Der Nachweis der **Internal Control DNA** ist in diesem Fall nicht notwendig, da hohe Konzentrationen des Amplikons zu einem schwachen oder fehlenden Signal der **Internal Control DNA** führen können.

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation zeigt, für die **Internal Control DNA** jedoch eine Amplifikation im Nachweissystem zu sehen ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der **Internal Control DNA** ausgeschlossen werden.

Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die **Internal Control DNA** keine Amplifikation im Nachweissystem zeigen. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR-Wasser verdünnt und erneut amplifiziert werden oder es sollte die Isolierung und Reinigung der Probe verbessert werden.

## 12. Grenzen der Methode

1. Dieser Test ist nur für die hier beschriebenen Abstrich- und Kulturproben geeignet.
2. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und -handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
3. Für die Anwendung PCR-basierter MRSA-Screeningverfahren gelten länderspezifische Richtlinien für deren Verwendung und Umsetzung der Anwender verantwortlich ist. So sind z.B. nach KRINKO in Deutschland PCR-basierte Screeningverfahren bis zum endgültigen kulturellen Ergebnis als vorläufig einzustufen, können jedoch als vorläufige Grundlage für abzuleitende krankenhaushygienische Konsequenzen dienen.
4. In der Literatur sind 14 SCCmec-Typen beschrieben. Die RIDA®GENE MRSA multiplex real-time PCR kann die SCCmec-Typen I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X und XI detektieren. RIDA®GENE MRSA detektiert möglicherweise keine anderen SCCmec-Typen und zeigt für diese negative Ergebnisse an.
5. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
6. Mutationen oder Polymorphismen in den Primer- oder Sondenbindungsregionen können den Nachweis neuer oder unbekannter Varianten beeinträchtigen und mit RIDA®GENE MRSA zu falsch negativen Ergebnissen führen.
7. Wie bei allen auf PCR basierenden *in-vitro* diagnostischen Tests können äußerst niedrige Konzentrationen der Zielsequenzen, die unter dem Detektionslimit (LoD) liegen, nachgewiesen werden. Die erhaltenen Ergebnisse sind nicht immer reproduzierbar.

8. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die entsprechenden Zielgene (*mecA* / *mecC* Gen, die *SCCmec* / *orfX* junction und das SA442-Gen) vorhanden sind.
9. Bei LoD-Proben kann auch bei einer MRSA-positiven Probe nicht in allen Kanälen ein Signal auftreten.
10. Aufgrund des Nachweises des Resistenzgens, könnte auch eine Mischinfektion aus MSSA (Methicillin-sensibler *S. aureus*) & CoNS (Koagulase-negative Staphylokokken) vorliegen.
11. Wird nur das Resistenzgen *mecA* / *mecC* nachgewiesen, ist MRSA nicht nachweisbar. Aufgrund des nachgewiesenen Resistenzgens kann aber geschlossen werden, dass ggf. eine Infektion mit Koagulase-negativem *Staphylococcus* vorliegt, da auch diese das Resistenzgen *mecA* / *mecC* besitzen können.
12. Ab einer getesteten Konzentration von 2,1 % zeigt ProntOral Mundspülung (Polyhexanid) einen inhibitorischen Effekt.
13. Ab einer getesteten Konzentration von 2,1 % zeigt Prontoderm Nasengel (Polyhexanid) einen inhibitorischen Effekt.
14. Ab einer getesteten Konzentration von 1,5 % zeigt Humanblut einen inhibitorischen Effekt.
15. Ab einer getesteten Menge von 6 mg zeigt COS Agar einen inhibitorischen Effekt.

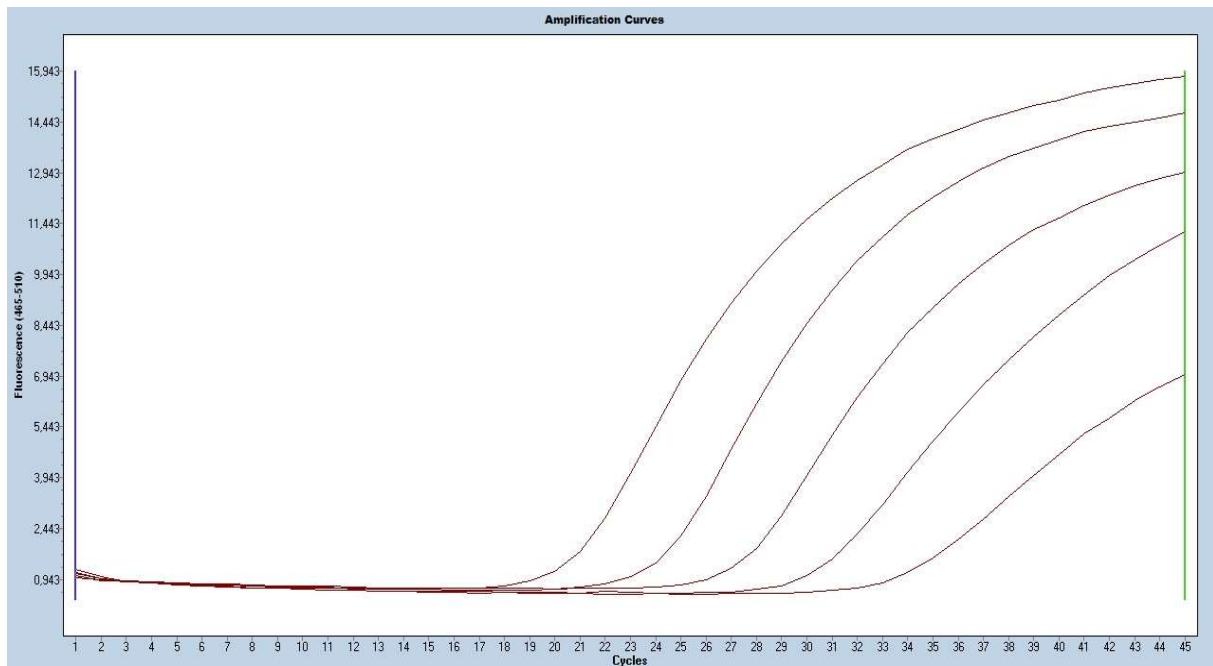


## 13. Leistungsmerkmale

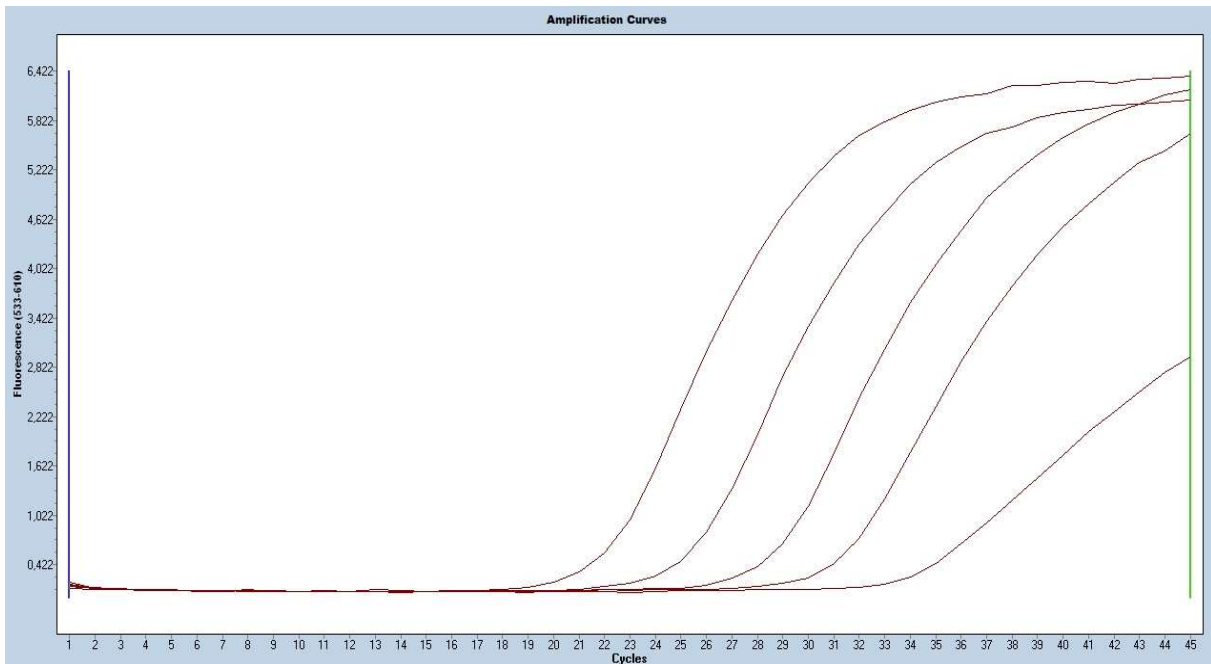
### 13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\geq 10$  DNA-Kopien/Reaktion für die SCCmec / orfX junction, das mecA / mecC-Gen und das SA442-Gen (*S. aureus*).

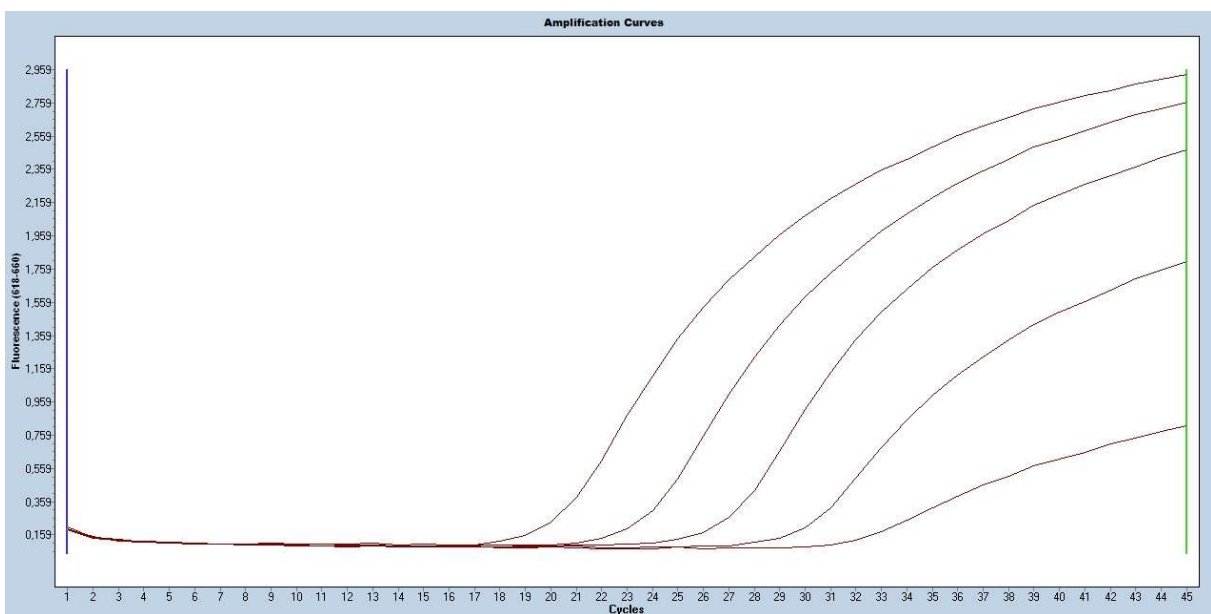
Die folgenden Abbildungen 4, 5, 6 und 7 zeigen Verdünnungsreihen von der SCCmec / orfX junction, dem mecA / mecC-Gen und dem SA442-Gen (*S. aureus*) (jeweils  $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II.



**Abb. 4:** Verdünnungsreihe der SCCmec/orfX junction ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 480II



**Abb. 5:** Verdünnungsreihe des SA442 Gens spezifisch für *S. aureus* ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II



**Abb. 6:** Verdünnungsreihe des mecA/mecC Gens ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien/ $\mu$ l) auf dem LightCycler® 480II

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, der DNA-Extraktion und dem DNA-Gehalt.

## 13.2 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des RIDA®GENE MRSA Tests wurde mit einem Panel aus Nicht-Staphylokokken-Spezies, Methicillin-sensiblen Koagulase-negativen Staphylokokken (MSCoNS) und Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken (MRCoNS) evaluiert. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s.Tab.10):

**Tab. 10:** Kreuzreaktivitätstestung

Nicht-Staphylokokken Spezies					
<i>Acinetobacter baumannii</i>	-	<i>Acinetobacter iwofii</i>	-	<i>Aeromonas hydrophila</i>	-
<i>Aspergillus fumigatus</i>	-	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Bacteroides fragilis</i>	-
<i>Candida albicans</i>	-	<i>Clostridium difficile</i>		<i>Candida glabrata</i>	-
<i>Clostridium perfringens</i>	-	<i>E. coli (O157:H7)</i>	-	<i>Enterobacter cloacae</i>	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	<i>Enterococcus faecium</i>	-	<i>Klebsiella oxytoca</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	<i>Proteus vulgaris</i>	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	-	<i>Streptococcus mitis</i>	-	<i>Streptococcus mutans</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	-		
Methicillin-sensible Koagulase-negative Staphylokokken					
<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. hominis</i>	-	<i>S. warneri</i>	-
Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken					
<i>S. haemolyticus</i>	-	<i>S. epidermidis</i>	-	<i>S. saprophyticus</i>	-

### 13.3. Interferierende Substanzen

Das Vorhandensein von RT-PCR-Inhibitoren und interferierenden Substanzen kann zu falsch-negativen oder ungültigen Ergebnissen führen. Daher wurden die Auswirkungen verschiedener Substanzen, die aufgrund verbreiteter Anwendung bei Atemwegsinfektionen oder verbreitetem Vorkommen in den entsprechenden Proben vorliegen könnten, untersucht. Für die Substanzen ProntOral Mundspülung (Polyhexanid), Humanblut, Prontoderm Nasengel (Polyhexanid) und COS-Agar wurden inhibitorische Effekte bei den getesteten Konzentrationen beobachtet (siehe Grenzen der Methode). Für die anderen aufgeführten Substanzen wurden keine Interferenzen festgestellt (s. Tabelle 11 und Tabelle 12):

**Tab. 11:** Liste der im Test verwendeten Substanzen und Konzentrationen (Abstrichproben)

Substanz / Zusatz	Konzentration
RatioAllerg (Beclometasondipropionat)	10,0 % (v/v)
Octenisan Nasengel (Octenidindihydrochlorid)	7,0 % (w/v)
Mucin	5,0 % (v/v)
Aciclovir (Salbe)	0,5 % (w/v)
InfectoPyoderm (Mupirocin)	1,80 % (w/v)
Tobramycin	0,0004 % (w/v)
Fenihydrocort (Hydrocortison)	7,0 % (w/v)

**Tab. 12:** Liste der im Test verwendeten Substanzen und Konzentrationen (Kultur)










Substanz / Zusatz	Konzentration
MRSA Agar	20 mg

## 14. Versionsübersicht

Versionsnummer	Kapitel und Bezeichnung
2020-11-17	Vorversion
2022-07-15	1. Zweckbestimmung 6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör 9.4 Detektionskanaleinstellung 10. Qualitätskontrolle

## 15. Symbolerklärung

### Allgemeine Symbole

	<i>In-vitro</i> -Diagnostikum
	Gebrauchsanweisung beachten
	Chargennummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl Tests
	Hersteldatum
	Hersteller

### Testspezifische Symbole

Reaction Mix

Taq-Polymerase

Internal Control DNA

No Template Control

Positive Control

Lysin Buffer 1

## 16. Literatur

1. Dulon M et al. MRSA prevalence in european healthcare settings: a review. *BMC Infectious Diseases* 2011, 11:138.
2. Köck R et al. The Epidemiology of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Germany. *Dtsch Arztebl Int* 2011, 108(45): 761-7.
3. Robert Koch Institut . *Staphylokokken (MRSA)*. RKI-Ratgeber für Ärzte 2009.
4. Kuehnert MJ et al. Prevalence of *Staphylococcus aureus* Nasal Colonization in the United States, 2001–2002. *JID* 2006, 193: 172-179.
5. Golding GR et al. Livestock-associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Sequence Type 398 in Humans, Canada. *EID* 2010, 16(4): 587-594.
6. RKI 2011. Auftreten und Verbreitung von MRSA in Deutschland 2010. *Epid. Bull.* 26.
7. International Working Group on the Staphylococcal Cassette Chromosome elements 2011. [http://www.sccmec.org/Pages/SCC\\_HomeEN.html](http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html).
8. Meng, X et al. Rapid Detection of *mecA* and *femA* Genes by Loop-Mediated Isothermal Amplification in a Microfluidic System for Discrimination of Different Staphylococcal Species and Prediction of Methicillin Resistance. *Frontiers in microbiology*. 2020, 11. Jg.
9. García-Álvarez, L et al. Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* with a novel *mecA* homologue in human and bovine populations in the UK and Denmark: a descriptive study. *Lancet Infect Dis* 2011, 11: 595–603.
10. Cosgrove SE et al. Comparison of mortality associated with methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* bacteremia: a meta-analysis. *Clin Infect Dis*. 2003, 36(1):53-59.
11. Cosgrove SE et al. The impact of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* bacteremia on patient outcomes: mortality, length of stay, and hospital charges. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2005, 26(2):166-174.
12. Jerningan JA et al. Prevalence of and Risk Factors for Colonization with Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* at the Time of Hospital Admission. *Infect Control and Hosp Epidemiol*. 2003, 24 (6): 409-414.
13. Diller R et al. Evidence for cost reduction based on pre-admission MRSA screening in general surgery *Int J Hyg Environ Health* 2008; 211 (1-2): 205-212.
14. Köck R, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill*. 2010, 15(41):19688.
15. Robicsek A et al. Universal Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 3 Affiliated Hospitals. *Ann Intern Med*. 2008, 148(6):409-418.