

RIDA[®] GENE MRSA
real-time PCR

Art. Nr.: PG0605
100 Reaktionen

Für die *in-vitro* Diagnostik.

 -20 °C



R-Biopharm AG, An der neuen Bergstraße 17, D-64297 Darmstadt, Germany
Tel.: +49 (0) 61 51 81 02-0 / Telefax: +49 (0) 61 51 81 02-20



1. Verwendungszweck

Für die *in-vitro* Diagnostik. 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) oder Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken aus humanen Nasen- und Nasen/Rachenabstrichen, Kulturproben, Wund- und Leistenabstrichen, sowie Achsel- und Perinealabstrichen.

Die RIDA®GENE MRSA multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch MRSA verursachten Infektion unterstützen.

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.^{1,2} 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.^{3,4} In den letzten Jahren treten auch mit der Tiermast, besonders bei Schweinehaltern, assoziierte MRSA Infektionen (livestock-associated MRSA oder auch LA-MRSA) auf.^{5,6} 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 SCCmec Genkassette (Staphylococcal cassette chromosome *mec*) lokalisiert. Bisher wurden 11 SCCmec Kassettentypen beschrieben, von denen die Typen I bis V am häufigsten vorkommen.^{3,7}

Der SCCmec Kassettentyp XI (SCCmec XI), der ein neues *mecA* Homolog (auch als *mecC* oder *mec*_{LGA251} 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.⁸

MRSA Infektionen sind im Gegensatz zu Infektionen mit MSSA (Methicillin-sensibler *Staphylococcus aureus*), mit einer erhöhten Morbidität, Mortalität, verlängertem Krankenhausaufenthalt und erhöhten Behandlungskosten assoziiert.^{9,10} 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.¹¹ Jede MRSA-Infektion verursacht bis zu 10.000 \$ zusätzliche Kosten.¹² 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.¹³ 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 Kulturmethode 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).¹⁴

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) oder Koagulase-negativen Methicillin-resistenten Staphylokokken. Nach der DNA-Isolierung wird (falls vorhanden) das *mecA* / *mecC* Gen, die *SCCmec* / *orfX* junction (Typen I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI) und das SA442-Gen, spezifisch für MRSA amplifiziert.

Die amplifizierten Zielsequenzen werden mit Hydrolyse-Sonden, die an einem Ende mit dem 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	orange
N	PCR Water	1x 500 µl	weiß
P	Positive Control	1x 200 µl	blau
L	Lysis Buffer 1	2x 12 ml	farblos

5. Reagenzien und ihre Lagerung

- Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Lysis Buffer 1, müssen lichtgeschützt bei -20 °C gelagert werden und können bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie mehr übernommen werden.
- Der Lysis Buffer 1 kann auch bei 2 – 8 °C gelagert werden und bis zum aufgedruckten Verfallsdatum verwendet werden. Nach Erreichen des Verfallsdatums kann keine Qualitätsgarantie übernommen werden.
- Vor dem Gebrauch sollten die Reagenzien, mit Ausnahme des Lysis Buffer 1, schonend und vollständig aufgetaut werden (z.B. im Kühlschrank bei 2 - 8 °C).
- Der Lysis Buffer 1 muss vor Gebrauch vollständig aufgetaut und auf Zimmertemperatur gebracht werden.
- Ein wiederholtes Einfrieren/Auftauen bis zu 5 Mal beeinträchtigt die Testeigenschaften nicht. (ggf. Aliquots nach dem ersten Auftauen herstellen und die Reagenzien sofort wieder einfrieren).
- Alle Reagenzien, mit Ausnahme des Lysis Buffer 1, während der PCR-Vorbereitung geeignet kühlen (2 - 8 °C).

6. Zusätzlich benötigte Reagenzien – erforderliches Zubehör

- Sterile, medienfreie Rayon oder Nylon beflockte Abstrichtupfer (z.B. Copan Diagnostic Inc. Katalognummer 155C oder 552C) oder Nylon beflockte Abstrichtupfer mit flüssigem Amies (z.B. Copan Diagnostic Inc. Katalognummer 480CE)
- Heizblock bei 95 °C
- Real-time PCR-Gerät:
 - Roche: LightCycler® 480II
 - Agilent Technologies: Mx3005P
 - Applied Biosystems: ABI 7500
 - Abbott: m2000rt
 - Bio-Rad: CFX96™
 - Cepheid: SmartCycler®
 - QIAGEN: Rotor-Gene Q

Bemerkung: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden

Sollten Sie weitere real-time PCR Geräte verwenden wollen, kontaktieren Sie bitte R-Biopharm zur Überprüfung der Kompatibilität unter mdx@r-biopharm.de.

- RIDA® GENE Color Compensation Kit I (PG0001) bei Verwendung des LightCycler® 480
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Reaktionsgefäße, Folien)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße oder Platten
 - Vortexer
 - Pipetten (0,5 – 20 µl, 20 – 200 µl, 100 – 1000 µl)
 - Pipettenspitzen mit Filtern
 - Puderfreie Einmalhandschuhe

7. Vorsichtsmaßnahmen

Nur für die *in-vitro* Diagnostik.

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 Test 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 Material Safety Data Sheets (MSDS) unter www.r-biopharm.com

8. Sammlung und Lagerung der Proben

8.1 Probenentnahme

Abstrichtupfer mit steriler, physiologischer Kochsalzlösung anfeuchten oder trocken verwenden. Nasenabstrichprobe mit dem empfohlenen Abstrichtupfer (siehe Abschnitt 6. Zusätzlich benötigte Geräte und Materialien) nach Angabe des Herstellers durchführen.

8.2 Probenvorbereitung

8.2.1 DNA-Isolierung 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. 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 (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die Internal Control DNA (ICD) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab.3).

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

8.2.2 DNA-Isolierung 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 (ICD), die entweder nur als Inhibitionskontrolle oder als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation und Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die Internal Control DNA (ICD) nur als Inhibitionskontrolle verwendet, muss 1 µl der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (s. Tab. 3).

Wird die Internal Control DNA (ICD) als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation **und** als Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD

während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD soll dem Proben-Lysispuffer Mix und **nicht** direkt dem Probenmaterial zugefügt werden.

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 Positiv- und eine Negativkontrolle mitgeführt werden.

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

Tab. 2: 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
	Gesamt	20 µl	220 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

Tab. 3: 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
	Gesamt	21,0 µl	231,0 µl

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren.

9.2 Herstellung des PCR-Mix

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

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

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

Proben: Je 5 µl DNA-Extrakt zum vorgelegten Master-Mix der Probenreaktionen pipettieren.

Positivkontrolle: Je 5 µl Positive Control zum vorgelegten Master-Mix in die dafür vorgesehenen Reaktionsgefäße pipettieren.

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

Bemerkung: Bei Verwendung des Rotor-Gene Q (QIAGEN) nur 0,1 ml Reaktionsgefäße verwenden.

Reaktionsgefäße bzw. Platte verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in das real-time PCR-Gerät überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab. 4, Tab. 5).

9.3 Geräteeinstellungen

Tab. 4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 480II, SmartCycler® und Rotor-Gene Q

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

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

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 - 4 auf 5.0 eingestellt werden. In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor. Einheiten“ individuell eingestellt werden müssen.

Tab. 5: Real-time PCR Profil für Mx3005P, ABI7500, m2000rt 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

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

9.4 Detektionskanaleinstellung

Tab. 6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Bemerkung
Roche LightCycler® 480II	SCCmec / orfX junction	465/510	RIDA®GENE Color Compensation Kit I (PG0001) wird benötigt
	ICD	533/580	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	533/610	
	mecA / mecC	618/660	
Cepheid SmartCycler®	SCCmec / orfX junction	Kanal 1	Stellen Sie die „Man. Grenzwert Fluor. Einheiten“ für Kanal 1 auf 10.0 und für Kanal 2 - 4 auf 5.0 ein*
	ICD	Kanal 2	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	Kanal 3	
	mecA / mecC	Kanal 4	
ABI 7500	SCCmec / orfX junction	FAM	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
Abbott m2000rt	SCCmec / orfX junction	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
Agilent Techn. Mx3005P	SCCmec / orfX junction	FAM	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	
Qiagen Rotor-Gene Q	SCCmec / orfX junction	Green	Die Gain-Einstellungen müssen für alle Kanäle auf 5 eingestellt sein
	ICD	Yellow	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	Orange	
	mecA / mecC	Red	
Bio-Rad CFX96™	SCCmec / orfX junction	FAM	-
	ICD	VIC	
	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ROX	
	mecA / mecC	Cy5	

*In Abhängigkeit des Gerätes kann es sein, dass die „Manuellen Grenzwert Fluor Einheiten“ individuell eingestellt werden müssen.

10. Qualitätskontrolle

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des jeweiligen real-time PCR-Gerätes nach den Angaben des Herstellers. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Tab. 7, Abb. 1, Abb. 2, Abb. 3).

Die Positivkontrolle liegt in einer Konzentration von 10^3 Kopien/ μ l vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von 5×10^3 Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Tab. 7: Ein valider PCR-Lauf muss die folgenden Bedingungen erfüllen:

Probe	Ergebnis	ICD Ct	Zielgen Ct
PTC	Positiv	NA ^{*1}	Siehe Quality Assurance Certificate
NTC	Negativ	Ct > 20	0

^{*1} Ein Ct-Wert für die ICD ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Wenn die Positivkontrolle (PTC) in dem angegebenen Ct-Bereich nicht detektiert wird, die Negativkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Positivkontrolle neu angesetzt werden.

Wenn die Negativkontrolle (NTC) nicht negativ ist, die Positivkontrolle jedoch valide ist, müssen alle Reaktionen inklusive der Negativkontrolle 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
- Visuelle Kontrolle der Kitkomponenten

Abb. 1: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (SCCmec / orfX junction) auf dem LightCycler® 480II

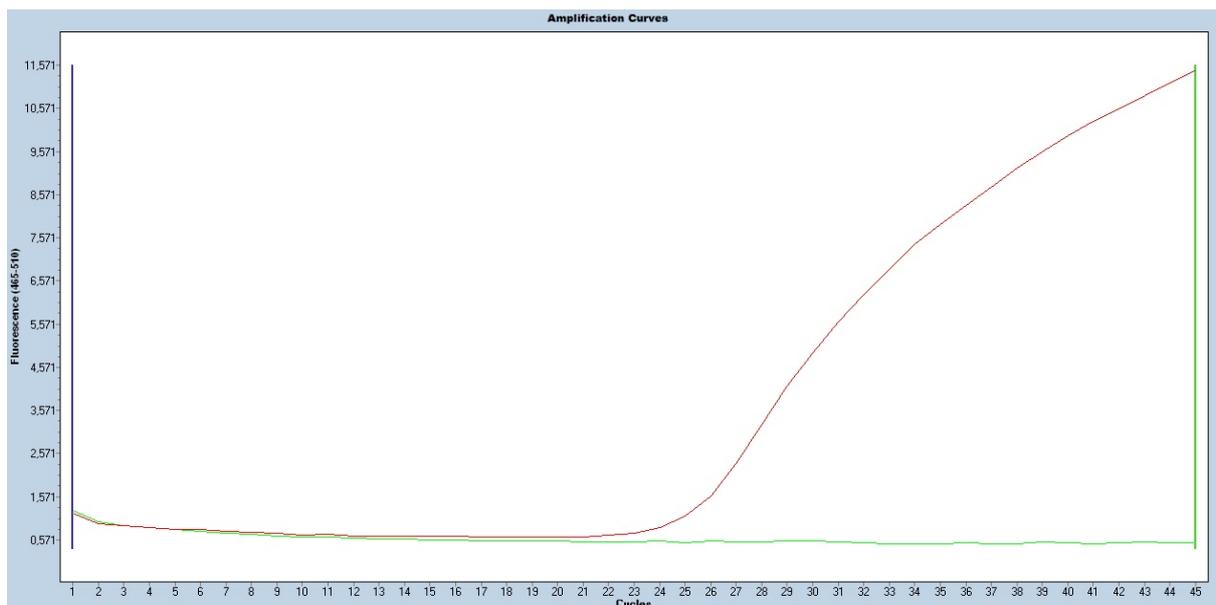


Abb. 2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (SA442 Gen (*S.aureus*)) auf dem LightCycler® 480II

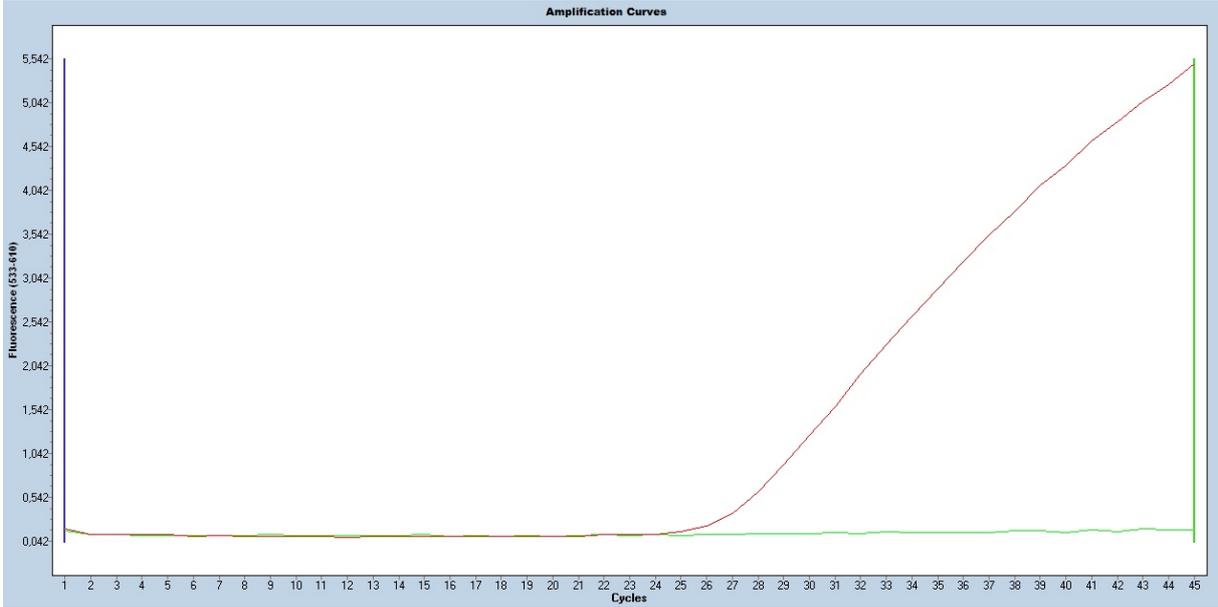
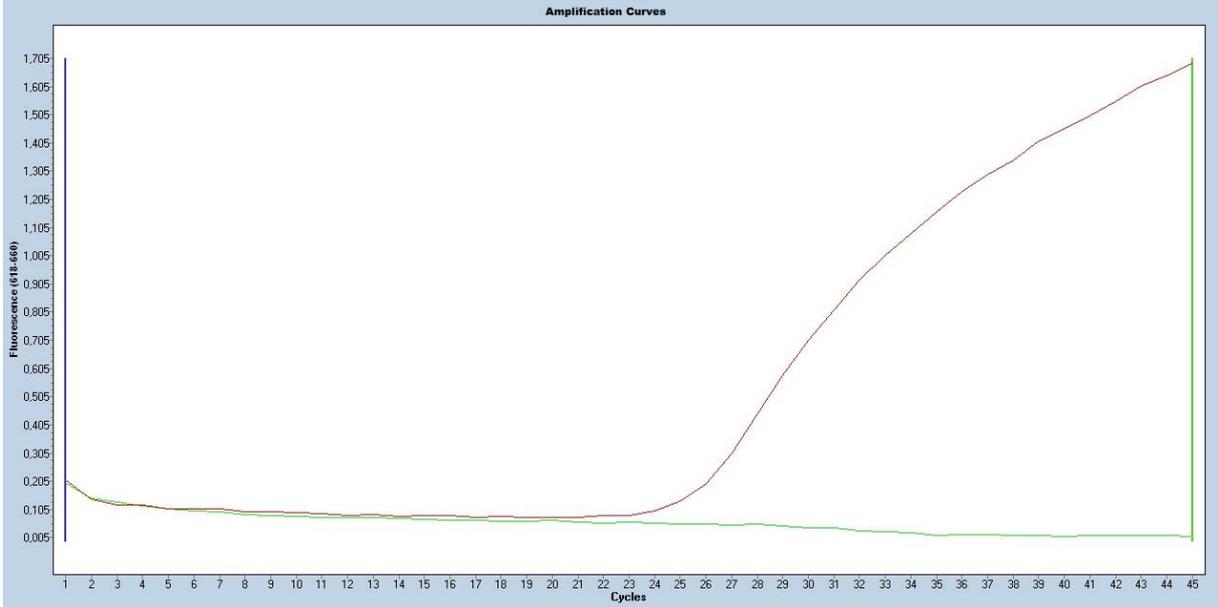


Abb.3: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (mecA/mecC Gen) auf dem LightCycler® 480II



11. Auswertung und Interpretation

Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 8.

Tab. 8: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene				
SCCmec / orfX junction	mecA / mecC	SA442 (<i>S.aureus</i>)	ICD	Ergebnis
positiv	positiv	positiv	positiv/negativ	MRSA*
negativ	positiv	positiv	positiv/negativ	Mischinfektion: MSSA** und CoNS*** (Methicillin-/Oxacillin-Resistenz)
positiv	negativ	positiv	positiv/negativ	MSSA**
negativ	negativ	positiv	positiv/negativ	MSSA**
negativ	positiv	negativ	positiv/negativ	CoNS*** (Methicillin-/Oxacillin-Resistenz)
negativ	negativ	negativ	positiv	Negativ (Zielgene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	negativ	Nicht auswertbar

* MRSA = Methicillin-resistenter *S. aureus*

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

*** CoNS = Koagulase-negative Staphylokokken

Eine Probe wird negativ bewertet, wenn die Probe keine Amplifikation im Nachweissystem zeigt und die zugehörige Internal Control DNA (ICD) positiv ist. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion bzw. ein Fehler im Extraktionsverfahren kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

Eine Probe wird positiv bewertet, wenn die Probe eine Amplifikation im Nachweissystem und in der dazugehörigen Internal Control DNA (ICD) zeigt.

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

Eine Probe ist nicht auswertbar, wenn die Probe und die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem keine Amplifikation 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. Das Ergebnis der molekularbiologischen Untersuchung sollte nicht allein zur Diagnose führen, sondern immer im Zusammenhang mit der Anamnese und Symptomatik des Patienten betrachtet werden.
2. 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.
3. Dieser Test ist nur für die hier beschriebenen Abstrich- und Kulturproben validiert.
4. Mutationen oder Polymorphismen in der Bindungsregion der Primer und Sonden können den Nachweis neuer oder unbekannter MRSA Varianten beeinträchtigen und mit dem RIDA[®]GENE MRSA zu falsch negativen Ergebnissen führen.
5. In der Literatur sind 11 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.
6. 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.
7. Ein positives Testergebnis zeigt nicht notwendigerweise die Anwesenheit lebensfähiger Organismen an. Ein positives Ergebnis deutet darauf hin, dass die Organismus DNA vorhanden ist, da der RIDA[®]GENE MRSA Test die SCCmec/orfX junction, eine spezifische *S. aureus* Sequenz auf dem SA442 Gen und das mecA (kodiert das Penicillin-bindende Protein (PBP2a)) und mecC Gen detektiert.
8. Der RIDA[®]GENE MRSA Test ergibt ein negatives MRSA-Ergebnis für borderline oxacillin-restistente *Staphylococcus aureus* (BORSA).
9. Ein positives RIDA[®]GENE MRSA-Testergebnis deutet nicht notwendigerweise auf ein Versagen der Eradikationsbehandlung hin, da DNA auch weiterhin

vorhanden sein kann. Ein negatives Testergebnis gefolgt auf ein zuerst positives Testergebnis kann eine erfolgreiche Eradikationsbehandlung anzeigen oder auf ein periodisches Ausscheiden zurückzuführen sein.

13. Leistungsmerkmale

13.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®] GENE MRSA multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≥ 10 DNA-Kopien / Reaktion für die SCCmec / orfX junction, das mecA / mecC-Gen und das SA442-Gen (*S. aureus*) (s.Abb. 4, Abb. 5, Abb. 6).

Abb. 4: Verdünnungsreihe der SCCmec/orfX junction (10^5 - 10^1 DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

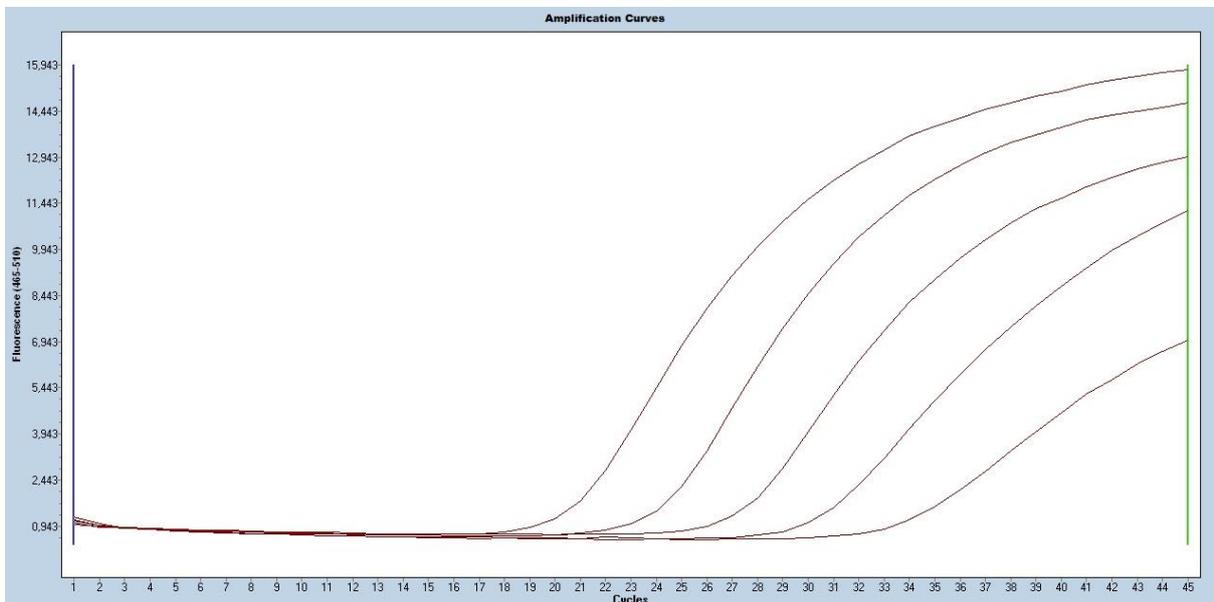


Abb. 5: Verdünnungsreihe des mecA/mecC Gens ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II

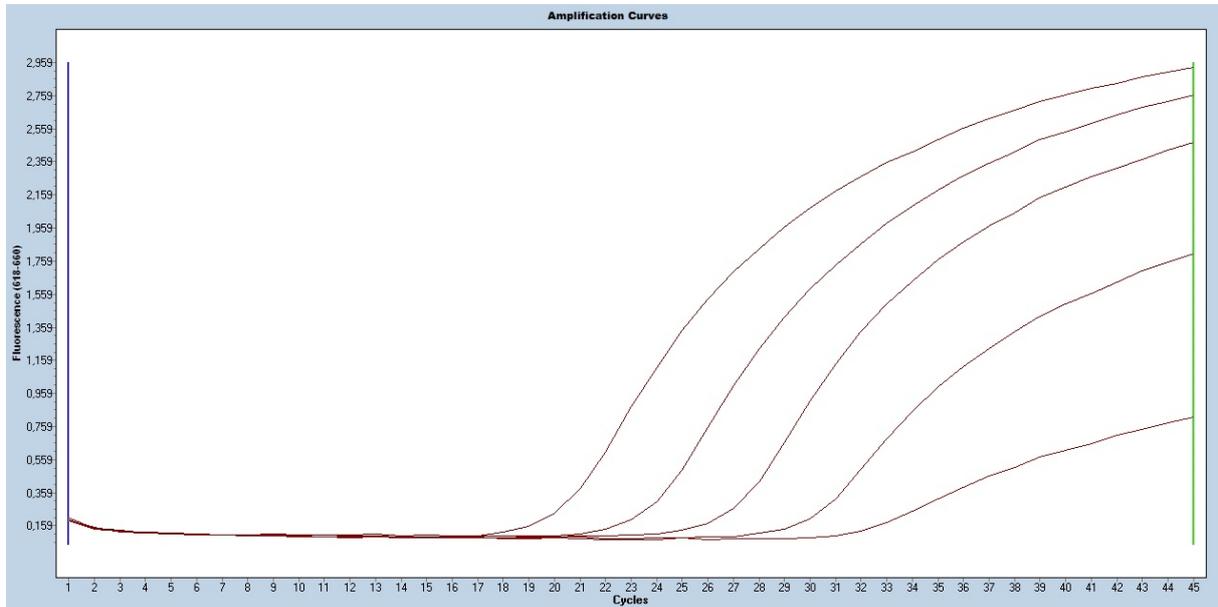
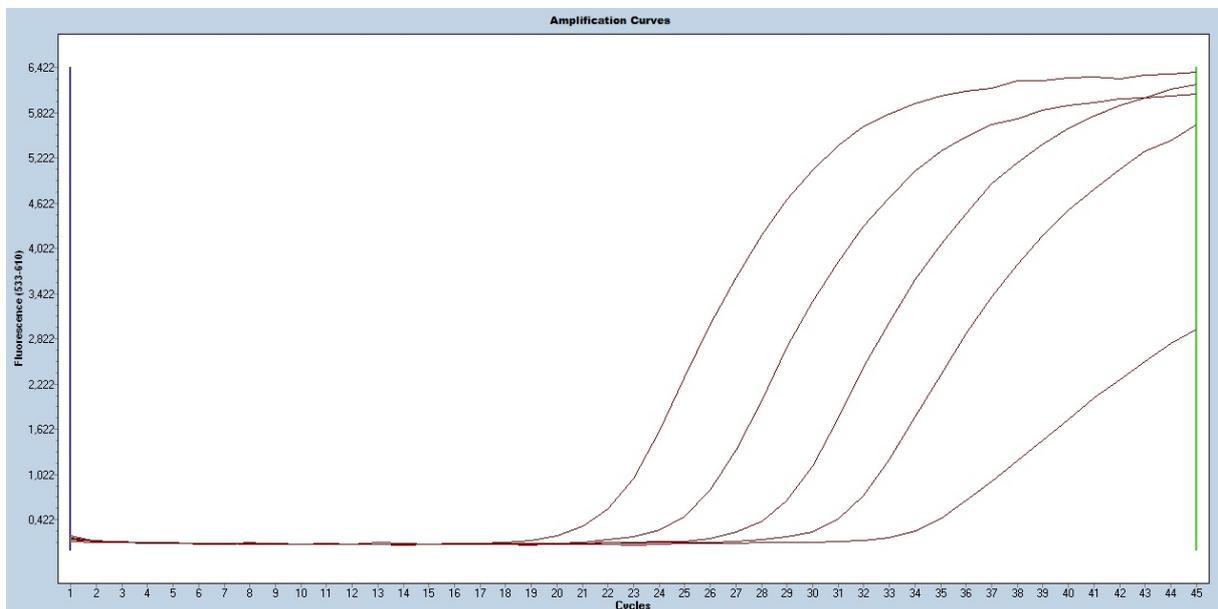


Abb.6: Verdünnungsreihe des SA442 Gens spezifisch für *S. aureus* ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien/ μ l) auf dem LightCycler[®] 480II



Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von der Probenmatrix, 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), Methicillin-resistenten Koagulase-negativen Staphylokokken (MRCoNS), Borderline Oxacillin-resistentem *Staphylococcus aureus* (BORSA) und Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* (MSSA) evaluiert (s. Tab. 9). Alle getesteten Spezies waren negativ für MRSA mit dem RIDA[®]GENE MRSA Test.

Tab. 9: Kreuzreaktivitätstestung

Nicht-Staphylokokken Spezies (getestete Anzahl)					
<i>Arcobacter butzleri</i> (1)	-	<i>Clostridium sordellii</i> (1)	-	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	-	Enteropathogene <i>E.coli</i> (1)	-	<i>Shigella flexneri</i> (1)	-
<i>Bacillus cereus</i> (1)	-	Enterotoxische <i>E. coli</i> (1)	-	<i>Streptococcus agalactiae</i> (Group B) (1)	-
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	-	Shigatoxin bildende <i>E.coli</i> (1)	-	<i>Streptococcus equisimilis</i> (Group C) (1)	-
<i>Campylobacter coli</i> (1)	-	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	-	<i>Streptococcus mutans</i> (1)	-
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	-	<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	-	<i>Streptococcus suis</i> (1)	-
<i>Candida albicans</i> (1)	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	-	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (1)	-
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	-	<i>Streptococcus pyogenes</i> (Group A) (1)	-
<i>Clostridium difficile</i> (1)		<i>Salmonella enteritidis</i> (1)		<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	-
<i>Clostridium perfringens</i> (1)		<i>Salmonella typhimurium</i> (1)		<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)	-
Methicillin-sensible Koagulase-negative Staphylokokken (getestete Anzahl)					
<i>S. epidermidis</i> (5)	-	<i>S. simulans</i> (1)	-	<i>S. xylosus</i> (1)	-
<i>S. hominis</i> (5)	-	<i>S. pettenkoferi</i> (1)	-		
<i>S. lugdunensis</i> (2)	-	<i>S. warneri</i> (5)	-		
Methicillin-sensible Koagulase-positive Staphylokokken (getestete Anzahl)					
<i>S. delphini</i> (1)	-	<i>S. hyicus</i> (1)	-	<i>S. pseudointermedius</i> (1)	-
Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken (getestete Anzahl)					
<i>S. haemolyticus</i> (3)	-	<i>S. epidermidis</i> (13)	-	<i>S. capitis</i> (3)	-
Borderline Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (1)					-
Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i> (9)					-

Symbolerklärungen

	Für die <i>in-vitro</i> Diagnostik
	Gebrauchsanweisung beachten
	Lotnummer
	verwendbar bis
	Lagertemperatur
	Artikelnummer
	Anzahl der Präparationen
	Herstellungsdatum
	Hersteller

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.
8. 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.
9. 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.

10. 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.
11. 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.
12. 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.
13. Köck R, et al. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA): burden of disease and control challenges in Europe. *Euro Surveill.* 2010, 15(41):19688.
14. Robicsek A et al. Universal Surveillance for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* in 3 Affiliated Hospitals. *Ann Intern Med.* 2008, 148(6):409-418.