


**RIDA<sup>®</sup> GENE MRSA LC2.0**  
real-time PCR

Art. Nr.: PG0625  
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 LC2.0 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 Nasenabstrichen und Kulturproben auf dem LightCycler® 2.0. Die RIDA®GENE MRSA LC2.0 multiplex real-time PCR soll die Diagnose einer durch MRSA verursachten Infektion unterstützen.

## 2. Erläuterung

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 treten auch community-acquired MRSA (CA-MRSA) Infektionen auf, 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 SCCmec Genkassette (Staphylococcal cassette chromosome *mec*) lokalisiert. Bisher wurden 11 SCCmec Kassettentypen beschrieben, von denen die Typen I bis V am häufigsten vorkommen.<sup>3,7</sup>

Der SCCmec Kassettentyp XI (SCCmec XI), der ein neues *mecA* Homolog (auch als *mecC* oder *mec<sub>LGA251</sub>* 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>8</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>9,10</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>11</sup> Jede MRSA-Infektion verursacht bis zu 10.000 \$ zusätzliche Kosten.<sup>12</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>13</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 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).<sup>14</sup>

### 3. Testprinzip

RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 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 werden (falls vorhanden) das für MRSA spezifische *mecA* / *mecC* Gen und die *SCCmec* / *orfX* junction (Typen I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI) 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<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 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 Geräte und Materialien

- 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: LightCycler<sup>®</sup> 2.0 (Roche)
- RIDA<sup>®</sup>GENE Color Compensation Kit II (PG0002)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Reaktionsgefäße)
- Zentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße
- 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.
- Eine räumliche Trennung von DNA-Isolierung, PCR-Ansatz und PCR ist zu beachten, um Querkontaminationen zu vermeiden.
- Dieser Test ist nur von molekularbiologisch geschultem Laborpersonal durchzuführen.
- Die Gebrauchsanweisung zur Durchführung des Tests ist strikt einzuhalten.
- Während des Umgangs mit Proben Einmalhandschuhe tragen und nach Abschluss des Tests die Hände waschen.
- In den Bereichen, in denen mit Proben gearbeitet wird, nicht rauchen, essen oder trinken.
- 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.
- Calciumalginat Abstrichtupfer und Abstrichtupfer mit Holz oder Aluminium Stabmaterial und/oder Baumwolle als Tupfermaterial können zur Inhibition bzw. falsch negativen Ergebnissen führen. Probenentnahme nur mit den empfohlenen Abstrichtupfern durchführen.

## 8. Testdurchführung

### 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 Nasenabstrich

Für die DNA-Isolierung aus Nasenabstrichen 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 12.000 rpm 1 min zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

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

Der RIDA®GENE MRSA LC2.0 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 12.000 rpm 1 min zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

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

Der RIDA®GENE MRSA LC2.0 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.

## 8.3 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
	<b>Gesamt</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

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
	<b>Gesamt</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

Master-Mix mischen und anschließend kurz abzentrifugieren

#### 8.4 Herstellung des PCR-Mix

Je 20 µl des Master-Mix in die jeweiligen Reaktionsgefäße 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.

Reaktionsgefäße verschließen, mit wenigen Umdrehungen pro Minute kurz abzentrifugieren und in den LightCycler® 2.0 überführen. Die PCR entsprechend der Geräteeinstellung starten (s. Tab.4).



## 8.5 Geräteeinstellungen

Tab.4: Real-time PCR Profil

Initiale Denaturierung	1 min, 95 °C
Zyklen	45 Zyklen
PCR 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.

## 8.6 Detektionskanaleinstellung

Tab.5: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Dark-Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	mecA / mecC	705	+	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	SCCmec / orfX junction	530	+	
	ICD	560	+	

## 9. Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Proben erfolgt über die Analyse-Software des LightCycler® 2.0 nach den Angaben des Herstellers. Negativ- und Positivkontrollen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen (s. Abb.1, Abb.2).

Die Positivkontrolle liegt in einer Konzentration von  $10^3$  Kopien /  $\mu\text{l}$  vor. Sie wird in einer Gesamtmenge von  $5 \times 10^3$  Kopien in jedem PCR Lauf eingesetzt.

Abb.1: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (SCCmec / orfX junction) auf dem LightCycler® 2.0

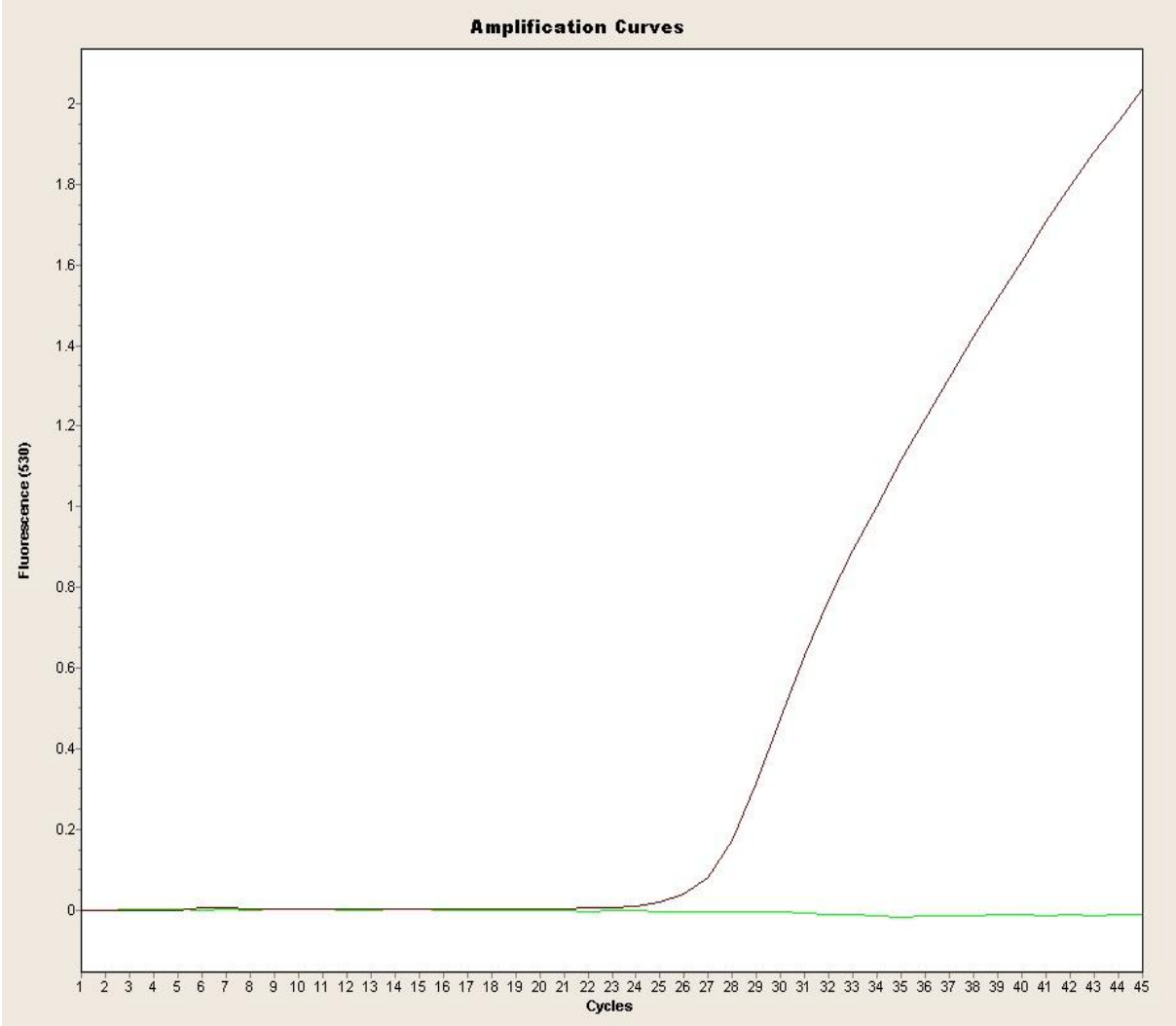
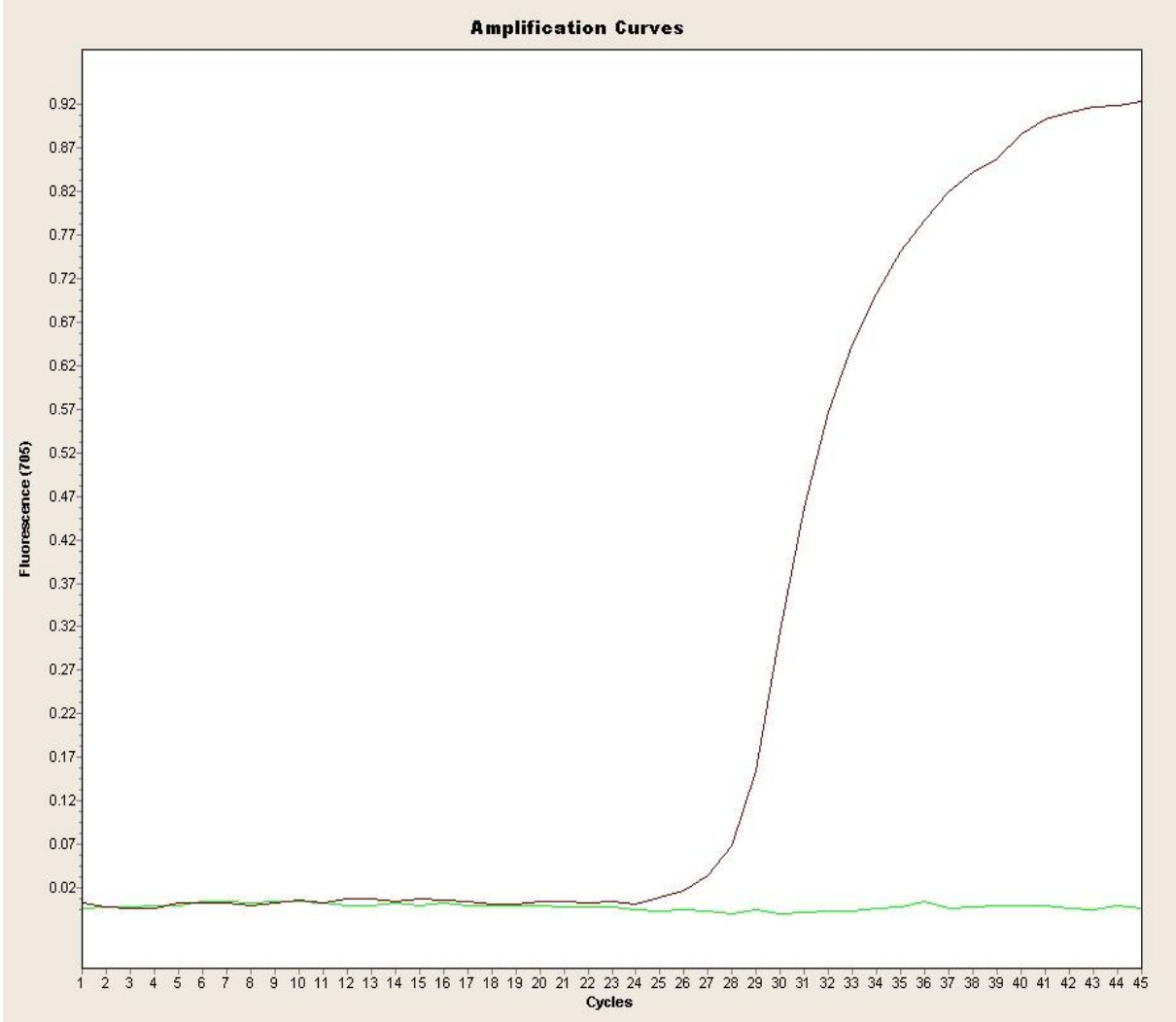


Abb.2: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (mecA / mecC Gen) auf dem LightCycler® 2.0



Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 6.

Tab.6: Interpretation der Ergebnisse

Zielgene			
SCCmec / orfX junction	mecA / mecC	ICD	Ergebnis
positiv	positiv	positiv/negativ	<b>MRSA*</b>
positiv	negativ	positiv/negativ	<b>MSSA**</b>
negativ	positiv	positiv/negativ	<b>CoNS***</b> (Methicillin-/Oxacillin-Resistenz)
negativ	negativ	positiv	<b>Negativ</b> (Zielgene sind nicht nachweisbar)
negativ	negativ	negativ	<b>Nicht auswertbar</b>

\* 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.

## 10. Testmerkmale

### 10.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 multiplex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien / Reaktion für die SCCmec / orfX junction und das mecA / mecC Gen (s.Abb.3, Abb.4).

Abb.3: Verdünnungsreihe der SCCmec / orfX junction ( $10^5 - 10^1$  DNA Kopien /  $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 2.0

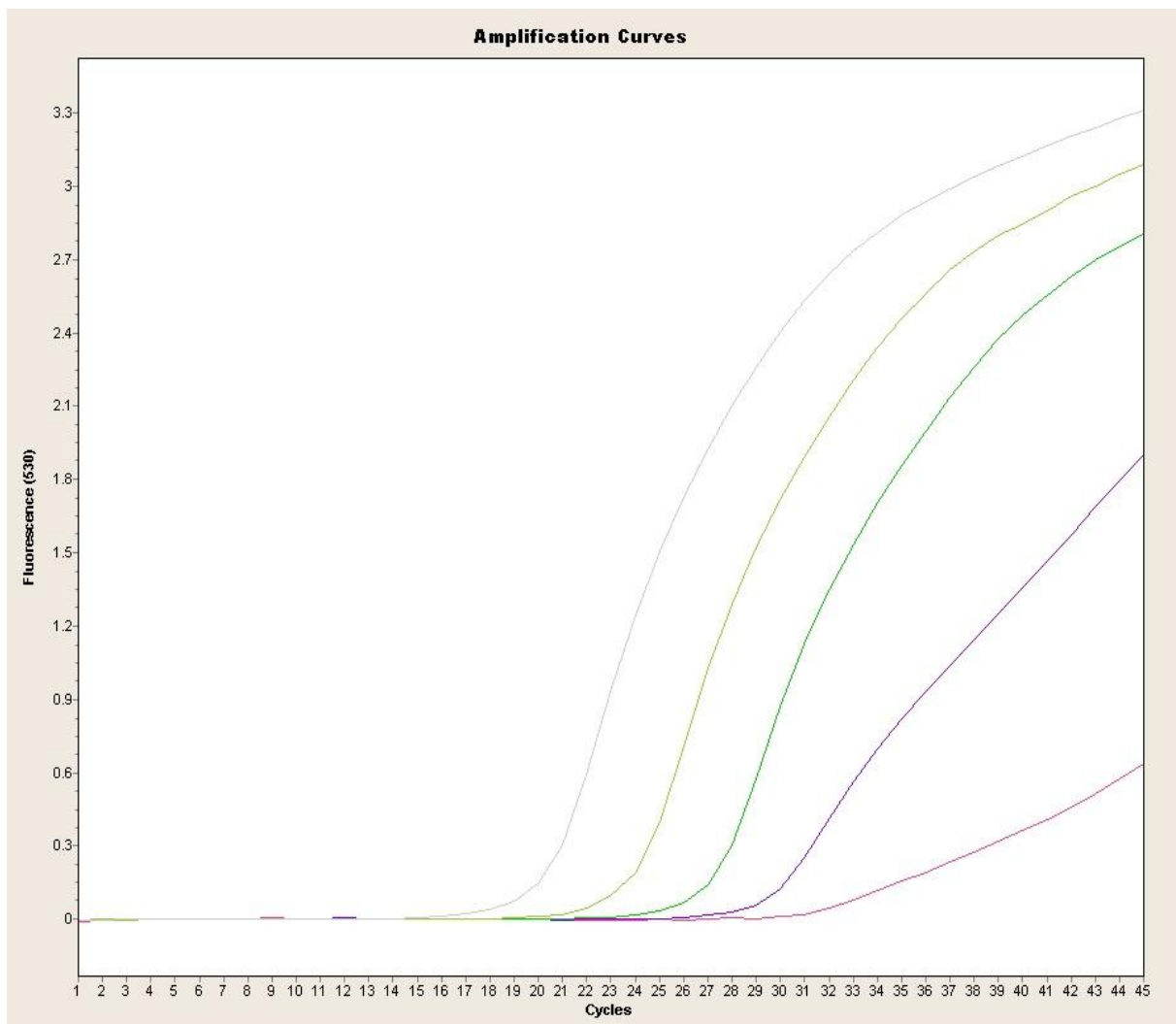
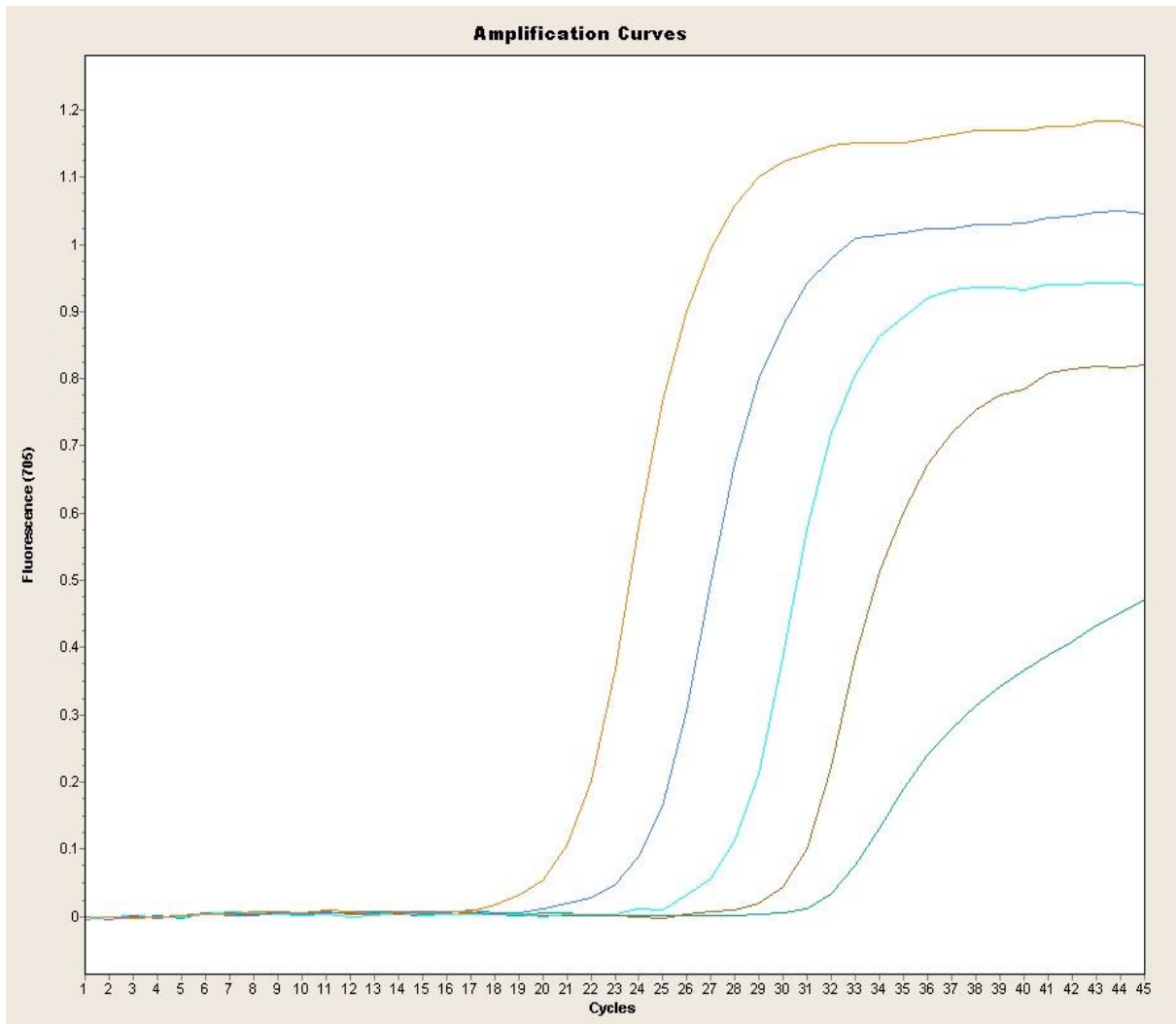


Abb.4: Verdünnungsreihe des mecA / mecC Gens ( $10^5$  -  $10^1$  DNA Kopien /  $\mu$ l) auf dem LightCycler<sup>®</sup> 2.0



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

## 10.2 Analytische Spezifität

Die analytische Spezifität des RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 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.7). Alle getesteten Spezies waren negativ für MRSA mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC 2.0 Test.

Tab.7: Kreuzreaktivitätstestung

Nicht-Staphylokokken Spezies (getestete Anzahl)					
<i>Arcobacter butzleri</i> (1)	-	<i>Clostridium difficile</i> (1)	-	<i>Klebsiella oxytoca</i> (1)	-
<i>Aeromonas hydrophila</i> (1)	-	<i>Clostridium perfringens</i> (1)	-	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1)	-
<i>Bacillus cereus</i> (1)	-	<i>Clostridium sordellii</i> (1)	-	<i>Salmonella enteritidis</i> (1)	-
<i>Bacteroides fragilis</i> (1)	-	Enteropathogene <i>E.coli</i> (1)	-	<i>Salmonella typhimurium</i> (1)	-
<i>Campylobacter coli</i> (1)	-	Enterotoxische <i>E. coli</i> (1)	-	<i>Serratia liquefaciens</i> (1)	-
<i>Campylobacter jejuni</i> (1)	-	Shigatoxin bildende <i>E.coli</i> (1)	-	<i>Shigella flexneri</i> (1)	-
<i>Candida albicans</i> (1)	-	<i>Enterobacter cloacae</i> (1)	-	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1)	-
<i>Citrobacter freundii</i> (1)	-	<i>Enterococcus faecalis</i> (1)	-	<i>Yersinia enterocolitica</i> (1)	-
Methicillin-sensible Koagulase-negative Staphylokokken (getestete Anzahl)					
<i>S. epidermidis</i> (4)	-	<i>S. warneri</i> (4)	-	<i>S. lugdunensis</i> (2)	-
<i>S. hominis</i> (4)	-	<i>S. pettenkoferi</i> (1)	-		
Methicillin-resistente Koagulase-negative Staphylokokken (getestete Anzahl)					
<i>S. haemolyticus</i> (2)	-	<i>S. epidermidis</i> (13)	-	<i>S. capitis</i> (2)	-
<b>Borderline Oxacillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (1)</b>					-
<b>Methicillin-sensible <i>Staphylococcus aureus</i> (9)</b>					-

## 11. Grenzen des Verfahrens

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. Dieser Test ist nur für Nasenabstrich- und Kulturproben validiert.
3. Mutationen oder Polymorphismen in der Bindungsregion der Primer und Sonden können den Nachweis neuer oder unbekannter MRSA Varianten beeinträchtigen und mit dem RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 Test zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. In der Literatur sind 11 SCCmec-Typen beschrieben. Die RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 multiplex real-time PCR kann die SCCmec-Typen I, II, III, IV, V, VI, VII, IX, X, XI detektieren. Der RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 Test detektiert möglicherweise keine anderen SCCmec-Typen und zeigt für diese negative Ergebnisse an.
5. 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.
6. 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<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 Test die SCCmec / orfX junction und das mecA (kodiert das Penicillin-bindende Protein (PBP2a)) und mecC Gen detektiert.
7. Ein positives RIDA<sup>®</sup>GENE MRSA LC2.0 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.



## 12. 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. García-Álvarez, L et al. Methicillin-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.