


RIDA[®] GENE PVL
real-time PCR

Art. Nr.: PG0645
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 PVL ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis des PVL-Gens (Panton-Valentine Leukozidin) aus Kulturproben. Die RIDA®GENE PVL real-time PCR soll die Diagnose einer durch PVL verursachten (Haut- / Weichteil-) Infektion unterstützen.

2. Erläuterung

Staphylococcus aureus (SA) ist ein natürlicher Besiedler der Haut und der Schleimhäute beim Menschen. Schätzungsweise 30% der gesunden Bevölkerung sind mit *S. aureus* kolonisiert (asymptomatische Träger). Stämme von *Staphylococcus aureus* mit einer Resistenz gegen Methicillin (Oxacillin) und dessen Derivate werden als MRSA (Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus*) bezeichnet. *Staphylococcus aureus* ist einer der bedeutendsten Erreger von nosokomialen Infektionen in Krankenhäusern und sonstigen Einrichtungen des Gesundheitswesens.^{1,2} Seit Mitte der 90er Jahre traten auch zunehmend Infektionen in der Bevölkerung auf, wenn kein Kontakt zu medizinischen Einrichtungen bestand. Die Zunahme an Infektionen in der Bevölkerung wird durch *Staphylococcus aureus*-Stämme, die den Virulenzfaktor Panton-Valentine Leukozidin (PVL) besitzen, verursacht. Häufig sind jüngere Menschen ohne Vorerkrankung betroffen.³ PVL kann sowohl von Methicillin-sensiblen *Staphylococcus aureus* Stämmen (MSSA) als auch von Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) Stämmen produziert werden. MRSA Stämme, die den Virulenzfaktor PVL besitzen, werden als CA-MRSA (community acquired MRSA) bezeichnet.^{4,5} Das Panton-Valentine Leukozidin ist ein aus zwei Komponenten bestehendes porenbildendes Zytotoxin, das durch die lukF-PV und lukS-PV Gene kodiert wird. Das Zytotoxin PVL lysiert sowohl Makrophagen als auch neutrophile Granulozyten und führt zu Gewebenekrosen.³ Klinisch manifestiert sich die Infektion mit PVL-positiven *Staphylococcus aureus* Stämmen in Form von Haut- und Weichteilinfektionen, insbesondere rezidivierende tiefgehende Abszesse. Sehr selten treten nekrotisierende Pneumonien mit einer Lethalität bis zu 75 % auf.^{3,4,5} Risikogruppen für die Übertragung von CA-MRSA oder PVL-MSSA sind z.B. Familien, Personen, die Kontaktsportarten betreiben, Schulklassen, Gefängnisinsassen und Militärangehörige.^{3,4} Infektionen durch PVL-MSSA und PVL-MRSA haben in den letzten Jahren weltweit zugenommen. In England wurden 2010 ca. 2.200 Fälle von PVL-SA durch das Health Protection Agency Referenzzentrum nachgewiesen.⁶ Das deutsche Nationale Referenzzentrum für Staphylokokken hat den Virulenzfaktor PVL in ca. 1,8 % (2005) bzw. 3,1 % (2006) der zugesendeten MRSA Isolate mit Verdacht auf CA-MRSA Infektion nachgewiesen. In den USA ist CA-MRSA der häufigste Erreger (> 50 %) von ambulant erworbenen

Haut- und Weichteilinfektionen geworden.² Bei der Diagnose von Haut- und Weichteilinfektionen, aber auch bei systemischen Erkrankungen durch PVL-SA (PVL-MRSA und PVL-MSSA), ist es sinnvoll den Virulenzfaktor PVL zu bestimmen, um geeignete therapeutische und hygienische Maßnahmen einzuleiten. Die real-time PCR ermöglicht einen schnellen und frühzeitigen Nachweis des Virulenzfaktors PVL.

3. Testprinzip

RIDA[®]GENE PVL ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis des PVL-Gens (Panton-Valentine Leukozidin) aus Kulturproben. Nach der DNA-Isolierung wird (falls vorhanden) das für PVL spezifische Genfragment (lukF-PV) 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 PVL 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 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 Testeigenschaft 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

- Heizblock bei 95 °C
- Real-time PCR-Gerät:
 - Roche: LightCycler® 2.0, LightCycler® 480II
 - Cepheid: SmartCycler®
 - Applied Biosystems: ABI 7500
 - Abbott: m2000rt
 - Stratagene: Mx3000P, Mx3005P
 - QIAGEN: Rotor-Gene Q
- RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) bei Verwendung des LightCycler® 2.0
- 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.
- Eine räumliche Trennung von Extraktion, 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.

8. Testdurchführung

8.1 Probenvorbereitung

8.1.1 DNA-Isolation aus Kulturproben

Für die DNA-Isolation aus Kulturproben wird folgende Isolationsmethode empfohlen: In ein Präparationsröhrchen 200 µl Lysis Buffer 1 geben. Mit einer Impföse mehrere Kolonien sammeln und im Lysis Buffer 1 suspendieren. Den Stab der Impföse abbrechen oder abschneiden. Das Präparationsröhrchen dicht verschließen und 60 sec stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 min 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 PVL 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 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	20,0 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

8.3 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.

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).

8.4 Geräteeinstellungen

Tab.4: Real-time PCR Profil für LightCycler® 480II, LightCycler® 2.0, SmartCycler® und Rotor-Gene Q

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.

Hinweis: Bei Verwendung des SmartCycler® (Cepheid) müssen die Man. Grenzwert Flour. Einheiten für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 auf 5.0 eingestellt werden.

Tab.5: Real-time PCR Profil für Mx3000P, Mx3005P, ABI 7500 und m2000rt

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

8.5 Detektionskanaleinstellung

Tab.6: Auswahl der geeigneten Detektionskanäle

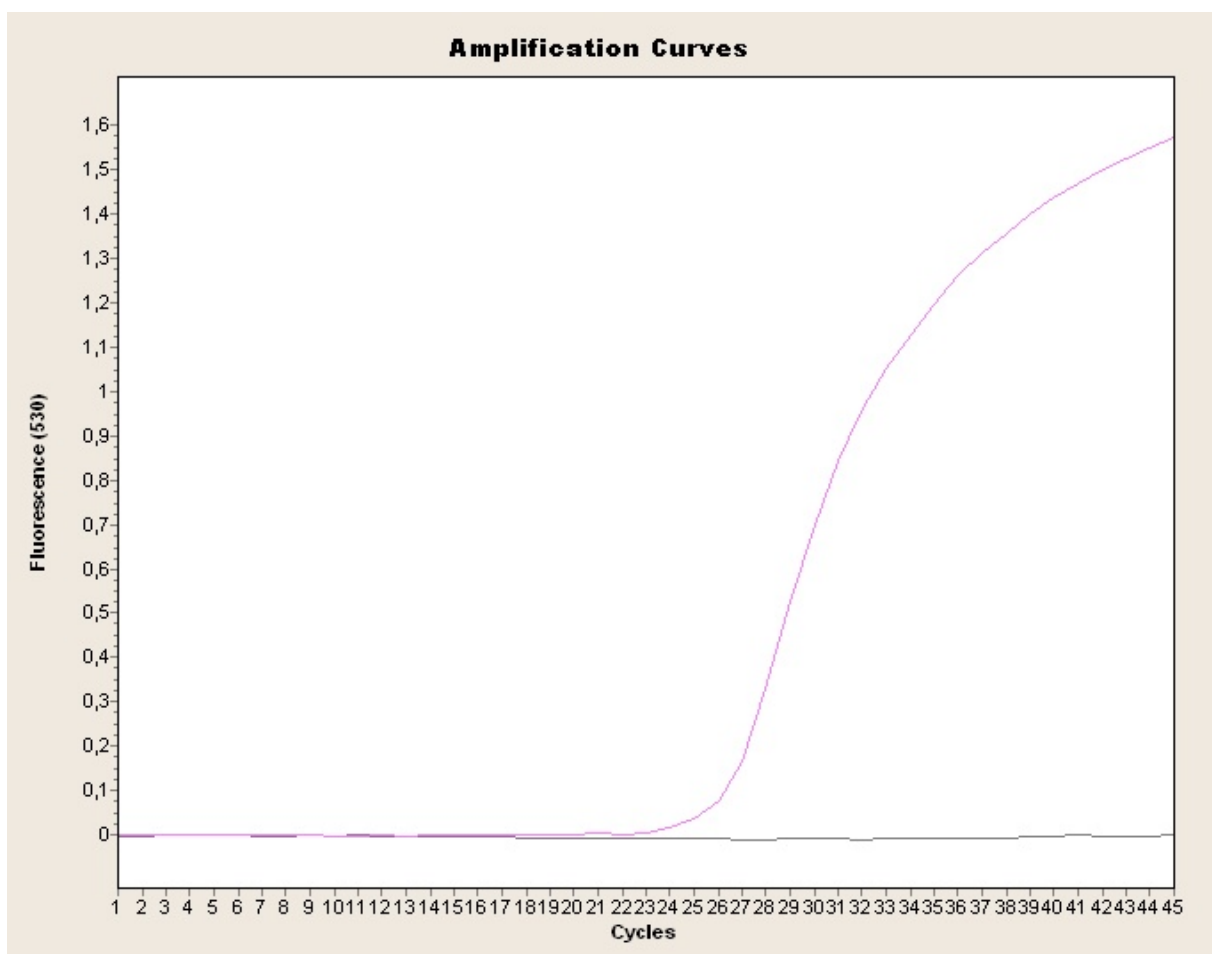
Real-time PCR Gerät	Nachweis	Detektionskanal	Dark-Quencher	Bemerkung
Roche LightCycler® 2.0	PVL	530	+	RIDA®GENE Color Compensation Kit II (PG0002) wird benötigt
	ICD	560	+	
Roche LightCycler® 480II	PVL	465/510	+	Color Compensation wird nicht benötigt
	ICD	533/580	+	
Cepheid SmartCycler®	PVL	Kanal 1	+	Stellen Sie die Man. Grenzwert Flour. Einheiten für Kanal 1 auf 30.0 und für Kanal 2 auf 5.0 ein
	ICD	Kanal 2	+	
ABI 7500	PVL	FAM	none	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none
	ICD	VIC	none	
Abbott m2000rt	PVL	FAM	none	-
	ICD	VIC	none	
Stratagene Mx3000P/ Mx3005P	PVL	FAM	+	Stellen Sie den Referenzfarbstoff auf none
	ICD	HEX	+	
Qiagen Rotor-Gene Q	PVL	Green	+	-
	ICD	Yellow	+	

9. Interpretation der Ergebnisse

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. Abb.1).

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

Abb.1: Korrekter Verlauf der Positiv- und Negativkontrolle (PVL-Gen) auf dem LightCycler[®] 2.0



Die Probenauswertung der Ergebnisse erfolgt nach Tabelle 7.

Tab.7: Interpretation der Ergebnisse

PVL-Gen	ICD	Ergebnis
positiv	positiv	PVL-Gen nachweisbar
positiv	negativ	PVL-Gen nachweisbar
negativ	positiv	PVL-Gen nicht nachweisbar
negativ	negativ	Ungültig

Das PVL-Gen ist nachweisbar, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt.

Das PVL-Gen ist ebenfalls nachweisbar, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation, jedoch keine Amplifikation für die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem 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 internen Amplifikationskontrolle führen können.

Das PVL-Gen ist nicht nachweisbar, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation, aber die Internal Control DNA (ICD) eine Amplifikation im Nachweissystem zeigt. Eine Inhibierung der PCR-Reaktion kann durch die Detektion der Internal Control DNA (ICD) ausgeschlossen werden.

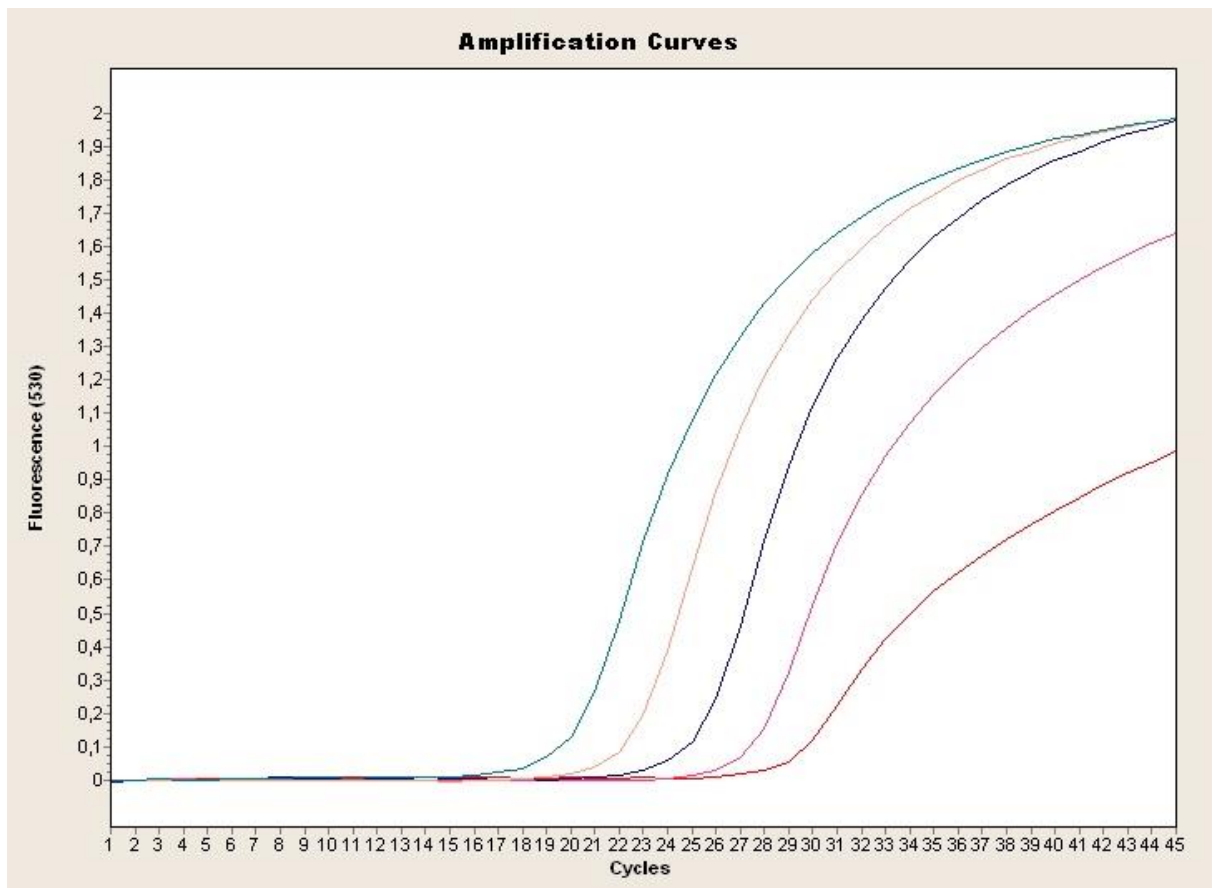
Eine Probe ist ungültig, wenn die Proben-DNA und die Internal Control DNA (ICD) im Nachweissystem keine Amplifikation zeigt. In der Probe sind PCR-Inhibitoren vorhanden bzw. es trat ein Fehler im Extraktionsverfahren auf. Die extrahierte Probe sollte 1:10 mit PCR Wasser verdünnt und erneut amplifiziert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

10. Testmerkmale

10.1 Analytische Sensitivität

Die RIDA[®]GENE PVL real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von ≤ 5 DNA-Kopien / Reaktion (s. Abb.2).

Abb.2: Verdünnungsreihe PVL-Gen ($10^5 - 10^1$ DNA Kopien / μ l) auf dem LightCycler[®] 2.0



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

10.2 Analytische Spezifität

Die RIDA®GENE PVL real-time PCR ist spezifisch für PVL-Gen (Panton-Valentine Leukozidin) aus Kulturproben. Es wurden keine Kreuzreaktivitäten zu den folgenden Spezies festgestellt (s. Tab.8):

Tab.8: Kreuzreaktivitätstestung

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

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 Kulturproben validiert.
3. Unsachgemäße Probenentnahme, -transport, -lagerung und –handhabung oder eine Erregerlast unterhalb der analytischen Sensitivität des Tests können zu falsch negativen Ergebnissen führen.
4. Die Anwesenheit von PCR-Inhibitoren kann zu nicht auswertbaren Ergebnissen führen.
5. Mutationen oder Polymorphismen in der Bindungsregion der Primer und Sonden können den Nachweis neuer oder unbekannter PVL Varianten beeinträchtigen und mit dem RIDA[®]GENE PVL zu falsch negativen Ergebnissen führen.
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 PVL Test das PVL-Gen spezifische lukF-PV detektiert.
8. Ein positives RIDA[®]GENE PVL-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. Dulong 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. David MZ and Daum RS. Community-Associated Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*: Epidemiology and Clinical Consequences of an Emerging Epidemic. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 2010, 23(3): 616–687.
4. Linde HJ and Lehn N. Community-associated MRSA: Klinik, Therapie, Hygiene. *Krankenh.yg. up2date* 2008, 3(1):29-44.
5. Zetola N et al. Community-acquired methicillin resistant *Staphylococcus aureus*: an emerging threat. *Lancet Infect Dis* 2005, 5: 275-286.
6. Health Protection Agency (2011). PVL–*Staphylococcus aureus* infections: an update, Health Protection Report, 5(7). <http://www.hpa.org.uk/hpr/archives/2011/news0711.htm#pvl>. Aufgerufen am 20.04.2013