

MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

REF MD04931, 96 Reaktionen

Nur für den professionellen Gebrauch in der In-vitro-Diagnostik.



DE

Gebrauchsanweisung

MD0493_IM_de

VERSION 2401, Januar 2024



Inhalt

1. Einleitung	3
2. Bestimmungsgemäße Verwendung	3
3. Grundsätze des Testverfahrens	3
4. Kit-Zusammensetzung.....	4
5. Lagerungs-, Stabilitäts- und Handhabungsbedingungen	4
6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente	4
7. Probenentnahme und -vorbereitung.....	4
8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise.....	5
8.1. Sicherheitshinweise	5
8.2. Handhabung und verfahrenstechnische Anforderungen	5
9. Prüfverfahren	5
9.1. Vorbereitung der Reaktion	5
9.2. Programmierung der Echtzeit-PCR- Ausrüstung.....	6
10. Datenanalyse.....	6
10.1. Kriterien für die Laufvalidierung	6
10.2. Interpretation der Testergebnisse	7
11. Bewertung der Leistung	8
11.1. Erwartete Ergebnisse	8
11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität	8
11.3. Analytische Spezifität	8
11.3.1. Kreuzreaktivität (Ausschluss) und Spezifität	8
11.3.2. Störende Substanzen	9
11.4. Präzision	9
11.4.1. Wiederholbarkeit	11
11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit	11
11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge	11
11.4.4. Reproduzierbarkeit durch den Bediener	11
11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten.....	11
11.5. Klinische Bewertung.....	12
12. Qualitätskontrolle	12
13. Technische Unterstützung	12
14. Markenzeichen und Haftungsausschlüsse	12
15. Erläuterung von Symbolen.....	13
16. Konformitätserklärung	14
17. Referenzen	15

1. Einleitung

Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) ist weltweit einer der häufigsten menschlichen Erreger nosokomialer und Gemeinschaftsinfektionen. *S. aureus* hat eine bemerkenswerte Fähigkeit, Resistenzen gegen Antibiotika zu erwerben, was erhebliche Auswirkungen auf die therapeutischen Möglichkeiten dieses pathogenen Bakteriums hat. In den 1960er Jahren wurde MRSA erstmals bei klinischen Isolaten von Patienten beobachtet, die im Vereinigten Königreich ins Krankenhaus eingeliefert wurden, aber seit den 1990er Jahren hat es sich schnell in der Gemeinschaft verbreitet. In den letzten zehn Jahren haben MRSA-Infektionen erheblich zugenommen, was es zu einem Thema von hoher Bedeutung macht. MRSA-Infektionen werden normalerweise in MRSA in Zusammenhang mit der Gemeinschaft (CA-MRSA), MRSA im Zusammenhang mit dem Gesundheitswesen (HA-MRSA) und MRSA im Zusammenhang mit Nutztieren (LA-MRSA) unterteilt. *S. aureus* entwickelt sich zu MRSA durch Aufnahme - über horizontalen Gentransfer - des Staphylokokken-Kassettenchromosoms *mec* (SCC *mec*), eines mobilen genetischen Elements, das die Gene *mecA* oder *mecC* codiert, die Resistenz gegen Oxacillin und Methicillin und damit gegen die meisten β -Lactam-Antibiotika verleihen. Staphylokokken-Resistenz gegen Oxacillin/Methicillin tritt auf, wenn ein Isolat ein verändertes Penicillin-bindendes Protein, PBP2a, trägt, das vom *mecA* (oder *mecC*) Gen codiert wird. Das neue Penicillin-bindende Protein bindet β -Lactame mit geringerer Avidität, was zu einer Resistenz gegen diese Klasse antimikrobieller Wirkstoffe führt. Bisher wurden 14 *mec*-Kassettentypen des SCC beschrieben, von denen die Typen I bis V am häufigsten vorkommen. Die SCC-*mec*-Kassette Typ XI enthält ein weiteres *mecA*-Homolog, das auch als *mecC* oder *mecALGA₂₅₁* bezeichnet wird. Klinische Proben enthalten häufig sowohl koagulasenegative *Staphylococcus* (CoNS) als auch *S. aureus*, die alle das *mecA*-Gen tragen können. Da daher der Nachweis von *mecA/mecC* alleine nicht ausreicht, um MRSA spezifisch zu identifizieren, sollten Proben parallel zum Nachweis des *mecA/mecC*-Gens spezifisch auf *S. aureus* getestet werden. Um den Nachweis falsch positiver Ergebnisse aufgrund des Vorhandenseins von Methicillin-resistentem CoNS oder Methicillin-sensitivem *Staphylococcus aureus* (MSSA) zu vermeiden und um zuvor beschriebenes MRSA in einer klinischen Probe genau nachzuweisen, sollte die spezifische *S. aureus*-Region, die sich zwischen dem konservierten offenen Leserahmen *orfX* und SCC*mec* befindet und das *mecA/mecC*-Gen enthält, analysiert werden. Darüber hinaus produziert *S. aureus* eine extrazelluläre Thermo-nuklease, die durch das artspezifische *nuc*-Gen codiert wird und üblicherweise verwendet wird, um *S. aureus* von den anderen *Staphylococcus spp.* zu unterscheiden.

Der kulturbasierte Nachweis von MRSA erfordert die Isolierung reiner Kolonien, gefolgt von Antibiotika-Empfindlichkeitstests, dem Nachweis des *mecA*-Gens oder dem Nachweis des PBP2a-Proteins. Die Implementierung dieses Prozesses dauert zwischen 24 und 72 Stunden. Angesichts der Geschwindigkeit, mit der sich MRSA-Infektionen ausbreiten können, insbesondere in Einrichtungen des Gesundheitswesens, in denen Träger häufig vorkommen, stellt die Möglichkeit, Ergebnisse der nasalen MRSA-Infektion am Tag der Aufnahme bereitzustellen, einen entscheidenden Vorteil für Infektionspräventionsprogramme dar. Die Anwendung von Echtzeit-PCR-basierten Assays für das MRSA-Screening von Nasenabstrichen kann die Durchlaufzeit auf 1 bis 2 Stunden verkürzen. Ein schnelles und genaues MRSA-Screening ermöglicht es, infizierte Patienten gezielt zu behandeln und geeignete Hygienemaßnahmen einzuleiten, um die Übertragung und Verbreitung von MRSA zu verhindern.

2. Bestimmungsgemäße Verwendung

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech ist ein molekularer Test, der auf der Echtzeit-PCR-Technologie basiert und für den schnellen Nachweis und die qualitative Diagnose von MRSA-Nukleinsäuren aus Nasenabstrichen bestimmt ist, die in einem Transportkit mit flüssigem Amies-Medium gesammelt wurden. Dieser Test soll als Hilfsmittel bei der Diagnose einer MRSA-Infektion in Kombination mit den klinischen Anzeichen und Symptomen und den epidemiologischen Risikofaktoren des Patienten verwendet werden. Der Test ist nicht dazu bestimmt, die Behandlung von MRSA-Infektionen anzuleiten oder zu überwachen. Die Echtzeit-PCR-Technik ermöglicht den Nachweis spezifischer MRSA-DNS-Targets in der Probe, falls vorhanden. Ein negatives Ergebnis schließt eine Besiedelung der Nase mit MRSA nicht aus und sollte nicht als alleiniges Instrument für die Behandlungsentscheidung des Patienten verwendet werden. Es gibt keine Kontraindikationen für die Verwendung des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD. Die Testung muss von spezialisierten und qualifizierten Laboranten durchgeführt werden, insbesondere in der Echtzeit-PCR-Technik und der molekularen *In-vitro*-Diagnostik. Das Kit sollte nur wie in dieser Gebrauchsanweisung angegeben verwendet werden.

3. Grundsätze des Testverfahrens

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech bietet eine Reihe von Reagenzien, Enzymen und Oligonukleotiden (Primer und Sonden) für den qualitativen Nachweis des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) unter Verwendung der Echtzeit-PCR-Technik (siehe Gerätespezifikationsanforderungen in **Abschnitt 6**). Das Kit weist Zielsequenzen von *mecA*-, *mecC*- und *nuc*-Genen sowie die SCC-*mec-orfX*-Verbindung nach. Diese genomischen Regionen wurden zuvor als spezifische genetische Marker für die MRSA-Identifizierung beschrieben. *S. aureus*-Resistenz gegenüber Methicillin/Oxacillin und anderen β -Lactam-Antibiotika wird durch die Gene *mecA* und *mecC* verliehen. Das *mecA*-Gen ist auf der variablen und instabilen SCC-*mec*-Genkassette (Staphylokokken-Kassettenchromosom *mec*) lokalisiert. Die SCC *mec*-Kassette Typ XI (SCC *mec* XI) enthält ein *mecA*-Homolog, das auch als *mecC* bezeichnet wird. Das *mecC*-Gen, das nur 70% Nukleotidhomologie zum herkömmlichen *mecA* aufweist, wurde in *S. aureus*-Isolaten von Menschen und Rindern beschrieben. Die SCC-*mec-orfX*-Verbindungsregion wurde speziell ausgewählt, um auf die Region zwischen einem konservierten offenen Leserahmen *orfX* in *S. aureus* und dem SCC-*mec*, das das *mecA*-Gen enthält, abzielen. Schließlich codiert das *nuc*-Gen eine thermostabile Nuklease von *S. aureus*, die es ermöglicht, *S. aureus* von anderen *Staphylococcus spp.* abzugrenzen. Der Nachweis dieser spezifischen Targets stellt sicher, dass nur MRSA in der Probe vorhanden ist.

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde entwickelt, um ein breites Erkennungsprofil zu haben und gleichzeitig spezifisch für den MRSA-Nachweis zu bleiben. Darüber hinaus wurde der Oligonukleotidsatz speziell für den Nachweis dieses Organismus entwickelt und weist keine signifikante Homologie mit anderen Genomen auf, was die hohe Spezifität und Nachweisempfindlichkeit des Tests widerspiegelt. Daher wurde das Kit so konzipiert, dass es spezifisch für MRSA ist und den Nachweis anderer Organismen, die ähnliche Infektionen verursachen, vermeidet. Die im Kit enthaltene interne Kontrolle bestätigt die Wirksamkeit des Nukleinsäureextraktionsprozesses sowie die Abwesenheit von PCR-Inhibitoren, die möglicherweise in den humanbiologischen Proben vorhanden sind. NZYtech überprüft regelmäßig MRSA-Zielsequenzen und veröffentlicht bei Bedarf eine neue Version dieses Kits. Zusätzlich enthält das Kit drei externe Kontrollen (zwei Positivkontrollen und eine Negativkontrolle), wie unten beschrieben. Die Positivkontrollen bestehen aus Nukleinsäurefragmenten, die alle vom Kit nachgewiesenen Zielsequenzen enthalten.

In diesem Kit basiert der qualitative Nachweis von DNS auf der Echtzeit-PCR-Technologie, die eine Referenzmethode in der molekularen Labordiagnostik ist. Es handelt sich um eine Methode mit hoher Sensitivität und Spezifität, um das Vorhandensein dieses Organismus genau

nachzuweisen. Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech basiert auf dem Prinzip der Erforschung des Vorhandenseins von MRSA-DNS, die mit einem Extraktionssystem isoliert und gereinigt wird. Die extrahierte DNS wird einer PCR-Amplifikation in einer einzigen Reaktion unter Verwendung von fünf hochspezifischen Primer/Sonden-Sets unterzogen, die das TaqMan®-Prinzip ausnutzen. In Gegenwart von MRSA-DNS binden die TaqMan®-Sonden an konservierte Regionen der *mecA*-, *mecC*- und *nuc*-Gene sowie an eine spezifische Region der *SCCmec-orfX*-Verbindung. Jedes dieser vier Ziele wird von zwei spezifischen Primerpaaren flankiert. Ein fünfter Primer-/Sondensatz fungiert als interne Kontrolle und weist das humane *RNaseP*-Gen (RP) nach. Der Nachweis der internen Kontrolle validiert die Wirksamkeit des Extraktionsprozesses und ermöglicht auch die Bestätigung, ob die PCR-Reaktion durch das Vorhandensein/Fehlen von Inhibitoren in klinischen Proben beeinträchtigt wurde. Um die Amplifikation der fünf spezifischen Ziele in einer einzigen Reaktion zu ermöglichen - MRSA (vier Primer/Sondensätze) und humane RNase P - sind spezifische Sonden unterschiedlich markiert, nämlich mit den Reporterfarbstoffen FAM™, HEX™, Texas Red® und Cy5™. Somit besteht dieses Kit aus einem Pentaplex-Assay, bei dem die Ziele *mecA* & *mecC*, *SCC mec/orfX*-Verbindung und *nuc* in den optischen Kanälen FAM, HEX/VIC/JOE bzw. Texas Red/JUN nachgewiesen werden, während das menschliche RP-Gen im optischen Cy5-Kanal detektiert wird. Diese Oligonukleotide-/Sondensätze werden in optimierten Konzentrationen bereitgestellt, um sicherzustellen, dass menschliche DNS, selbst wenn sie in extrem hohen Konzentrationen vorhanden ist, die Effizienz der MRSA-Primer-/Sondensätze nicht einschränkt.

4. Kit-Zusammensetzung

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech bietet einen umfassenden Satz an Reagenzien, der ausreicht, um 96 qPCR-Reaktionen in einem einzigen Schritt durchzuführen.

BESTANDTEILE DES KITS		VOLUMEN (PRO FLÄSCHCHEN)	ANZAHL DER RÖHRCHEN	FARBE DES DECKELS
MRSA MMix	NZYSupreme Multiplex qPCR Sonden-Master-Mischung (2x)	1050 µL	1	Neutral
MRSA PPMix	MRSA/RP-Primer- und Sondenmischung (10x)	205 µL	1	Braun
MRSA POS 1	MRSA/RP-Positivkontrolle 1	105 µL	1	Rot
MRSA POS 2	MRSA/RP-Positivkontrolle 2	105 µL	1	Rot
NTC	No-Template Control	105 µL	1	Neutral

5. Lagerungs-, Stabilitäts- und Handhabungsbedingungen

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wird gekühlt versandt. Alle Komponenten sollten sofort nach Ankunft bei -85 °C bis -15 °C gelagert werden. Bei Verwendung sollten die Kit-Komponenten sofort nach Gebrauch in den Gefrierschrank zurückgelegt werden, um die Zeit in Raumtemperatur-Umgebung zu minimieren. Außerdem sollte Folgendes beachtet werden:

- Minimieren Sie die Anzahl der Einfrier-Auftauzyklen durch Lagerung in Arbeitsaliquoten. Gegebenenfalls können die Kit-Komponenten nach dem Auftauen in kleineren Volumina aliquotiert werden. Das Kit ist über mindestens 6 Gefrier-Tau-Zyklen stabil.
- Die MRSA PPMix-Komponente sollte vor Licht geschützt gelagert werden. Setzen Sie MRSA MMix insbesondere nach der Kombination mit MRSA PPMix nicht direktem Sonnenlicht aus.
- Wenn die Verpackung, die das Kit schützt, beschädigt ankommt, wenden Sie sich bitte an NZYtech.
- Achten Sie auf das auf der Verpackung angegebene Verfallsdatum. NZYtech rät davon ab, das Kit nach Ablauf des Verfallsdatums zu verwenden. Nach Ablauf des Verfallsdatums muss das Kit gemäß den Anweisungen in **Abschnitt 8.2** entsorgt werden.

6. Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien und Instrumente

- Echtzeit-PCR-Ausrüstung zum Nachweis von FAM™-, HEX™/VIC™/JOE™-, Texas Red™/JUN™- und Cy5™- Fluoreszenzfarbstoffen (bei Emissionswellenlängen von 520, 556, 615 bzw. 670 nm). Siehe die Gerätemodelle in **Abschnitt 11**, für die das Kit validiert wurde.
- Geräte und Verbrauchsmaterialien für die Isolierung von DNS aus biologischen/klinischen Proben.
- qPCR-Plastikware ohne RNase/DNase: PCR-Gefäße, Streifen, Deckel, Titerplatten mit 96 Nöpfchen, Klebefolien.
- Pipetten und Filterspitzen (ohne RNase/DNase).
- Kühlblock.
- Einweghandschuhe.
- Vortex- und Zentrifugerät

7. Probenentnahme und -vorbereitung

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, dient zum Nachweis von DNS, die aus Nasenabstrichproben extrahiert wurde. Nasenproben sollten nacheinander aus beiden Nasenlöchern mit einem einzigartigen Tupfer (ESwab®, Copan) entnommen werden. Legen Sie den Nasenabstrich in das Transportröhrchen mit dem flüssigen Amies-Transportmedium. Die Sammlung muss in sterilen Röhrchen erfolgen. Die Proben sollten in geeigneten Röhrchen oder Behältern dicht verschlossen, korrekt beschriftet und dann unverzüglich zum Labor transportiert werden. Die entnommenen Proben sollten so schnell wie möglich getestet werden. Eine unsachgemäße Probenentnahme, Handhabung und/oder unsachgemäßer Transport der Proben kann zu einem falschen Ergebnis führen. Extrahierte Nukleinsäuren bilden das Ausgangsmaterial für den Test mit dem MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD von NZYtech. NZYtech empfiehlt die Verwendung eines der folgenden Nukleinsäure-Reinigungskits auf Basis der magnetischen Bead-Technologie: NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) oder chemagic Pathogenic NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), da diese Kits für die Extraktion klinischer MRSA-Proben und den anschließenden Nachweis mit dem MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD validiert wurden. Bitte stellen Sie sicher, dass die DNS-Proben hinsichtlich Reinheit, Konzentration und Nukleinsäureintegrität geeignet sind. Da Ethanol ein starker Inhibitor der Echtzeit-PCR ist, muss diese Komponente vor der Elution der Nukleinsäuren während des Extraktionsprozesses eliminiert werden. Das Kit von NZYtech enthält eine interne Kontrolle, die auf menschliche

DNS abzielt, die zusammen mit bakterieller MRSA-DNS gereinigt wurde. Menschliche DNS wird mit dem Satz von Oligonukleotiden (Primer und Sonde) aus dem menschlichen RP-Gen amplifiziert. Die Einführung der internen Kontrolle ist nützlich, um die Effizienz der DNS-Extraktion und -Isolierung zu bewerten und/oder um das Vorhandensein potenzieller Inhibitoren während der Probenverarbeitung nachzuweisen.

8. Vorsichtsmaßnahmen und Warnhinweise

Befolgen Sie sorgfältig die in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren und Richtlinien, um sicherzustellen, dass der Test korrekt durchgeführt wird. Überprüfen Sie vor der Verwendung des Tests die Unversehrtheit des Produkts, insbesondere die Menge und Art der Kit-Komponenten und deren korrekte Kennzeichnung. Wie bei jedem analytischen Testverfahren ist eine gute Laborpraxis unerlässlich. Jede Abweichung von der guten Laborpraxis kann zum Scheitern des Tests oder zu fehlerhaften Ergebnissen führen. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit des Kits muss besonders darauf geachtet werden, dass die Reagenzien und PCR-Amplifikationsmischungen frei von Verunreinigungen sind.

8.1. Sicherheitshinweise

Lesen Sie vor der Verwendung des Kits das Sicherheitsdatenblatt (SDB), das auf der Website von NZYtech (www.nzytech.com) verfügbar ist. Der Nachweis mit diesem Kit sollte nur von Personal durchgeführt werden, das in den entsprechenden technischen und sicherheitstechnischen Verfahren in entsprechend ausgestatteten Labors geschult ist. Die internationalen und nationalen Richtlinien zur biologischen Sicherheit im Labor sollten unter allen Umständen befolgt werden.

8.2. Handhabung und verfahrenstechnische Anforderungen

- Nur für den professionellen Einsatz in der *In-vitro*-Diagnostik.
- Verwenden Sie dieses Kit nicht nach Ablauf des Verfallsdatums.
- Verwenden Sie die Testkomponenten nicht, wenn die Versiegelung des Kits beschädigt ist.
- Reagenzien verschiedener Produktionschargen dürfen nicht ausgetauscht werden.
- Es dürfen keine Reagenzien anderer Hersteller zusammen mit den Reagenzien dieses Kits verwendet werden.
- Bei allen Verfahren sollten DNase/RNase-freie Einweg-Plastikbehälter und -Pipetten verwendet werden.
- Probenvorbereitung, Reaktionsaufbau und Amplifikation sollten in unterschiedlichen Arbeitsbereichen durchgeführt werden. Die Reihenfolge der Aufgaben im Labor sollte unidirektional sein. Tragen Sie in jedem Bereich Einweghandschuhe und wechseln Sie diese, bevor Sie einen anderen Bereich betreten. Wenn möglich, wechseln Sie Ihren Kittel.
- Wählen Sie für jeden einzelnen Arbeitsbereich spezifische Materialien und Ausrüstungen aus und übertragen Sie diese nicht von einem Bereich in einen anderen.
- Verwenden Sie immer die im Kit enthaltene NTC – No-Template Control (Kontrolle ohne Vorlage).
- Biologische Proben müssen so gehandhabt werden, als ob sie infektiös wären, und es müssen angemessene Vorsichtsmaßnahmen zur biologischen Sicherheit eingehalten werden.
- Positivkontrollen enthalten Vorlagen mit hoher Kopienzahl; Sie sollten räumlich getrennt von Testproben und Kitkomponenten geöffnet und verarbeitet werden, um eine Kreuzkontamination zu vermeiden.
- Behandeln Sie Platten nach der Amplifikation mit Sorgfalt und entsorgen Sie sie sofort nach dem Ende des Tests; Platten sollten nach Gebrauch immer in einem geeigneten Behälter für biologische Gefahrenstoffe entsorgt werden. Reaktionsgefäße/Platten nach der Amplifikation nicht öffnen, um eine Amplikonkontamination zu vermeiden.
- Reinigen Sie am Ende jedes Tests die Arbeitsflächen und Geräte mit einem DNS/RNS-Entferner.
- Rückstände von Chemikalien und Zubereitungen gelten allgemein als gefährlicher Abfall. Die Entsorgung dieser Art von Abfall wird durch nationale und regionale Gesetze und Vorschriften geregelt.
- Alle Ergebnisse sollten von medizinischem Fachpersonal im Zusammenhang mit der Krankengeschichte und den klinischen Symptomen des Patienten interpretiert werden.
- Dieser Test kann Krankheiten, die durch andere Krankheitserreger verursacht werden, nicht ausschließen.
- Ein negatives Ergebnis bei einem PCR-Test schließt die Möglichkeit einer Infektion nicht endgültig aus.
- Befolgen Sie die gute Laborpraxis, tragen Sie Schutzkleidung, tragen Sie dauerhaft puderfreie Einweghandschuhe und verwenden Sie eine Schutzbrille und eine Maske. Essen, trinken und rauchen Sie nicht im Arbeitsbereich.

9. Prüfverfahren

Bitte lesen Sie die Gebrauchsanweisung sorgfältig durch, bevor Sie den Test durchführen. Beachten Sie, dass alle Pipettierschritte und die Einrichtung der experimentellen Platte gemäß guter qPCR-Praktiken durchgeführt werden sollten. Nach dem Ausgießen der Platte sofort mit dem Echtzeit-PCR-Protokoll beginnen. Eine längere Inkubation von Reaktionsmischungen bei Raumtemperatur kann zu PCR-Artefakten führen, die die Nachweisempfindlichkeit verringern. Beginnen Sie vor dem Experiment damit, die mitgelieferten Reaktionsröhrchen vorsichtig mit dem Finger zu mischen und fünf Sekunden lang zu zentrifugieren, um den Inhalt am Boden des Röhrchens zu sammeln. Röhrchen auf Eis stellen. **Wir empfehlen dringend, MRSA POS 1 und MRSA POS 2 zuletzt zu pipettieren, um Kreuzkontaminationen zu vermeiden.**

9.1. Vorbereitung der Reaktion

1. Bereiten Sie eine qPCR-Mischung vor, die für die Anzahl der durchzuführenden Tests ausreicht, mit einem zusätzlichen Volumen von 5% für Pipettierverluste. Gehen Sie gemäß der folgenden Tabelle vor, die die Volumina für 1 und n Tests angibt (wobei n der Gesamtzahl der Reaktionen entspricht):

KOMPONENTE	1 TESTVOLUMEN (μL)	<i>n</i> TESTS * VOLUMEN + 5% (μL)
MRSA MMix **	10	<i>n</i> x 10,5
MRSA PPMix	2	<i>n</i> x 2,1
ENDVOLUMEN	12	<i>n</i> x 12,6

* Um die Gesamtzahl der für jeden Test erforderlichen Reaktionen zu berechnen, zählen Sie die Anzahl der Proben und fügen Sie drei weitere hinzu, um die Negativ- und die beiden Positivkontrollen einzubeziehen.

** Bitte beachten Sie, dass ein Niederschlag am Boden des Master-Mix-Röhrchens beobachtet werden kann, insbesondere nach mehreren Gefrier-/Auftauzyklen. Um eine optimale Leistung zu gewährleisten, stellen Sie bitte sicher, dass alle Komponenten vor der Verwendung aufgetaut und resuspendiert sind. Zentrifugieren Sie in diesem Fall den Mastermix nicht vor dem Pipettieren.

- Pipettieren Sie 12 μL der qPCR-Mischung in die einzelnen Vertiefungen entsprechend dem Aufbau Ihrer Echtzeit-PCR-Versuchsplatte.
- Geben Sie für die Negativkontrolle 8 μL NTC anstelle der DNS-Matrize in das Negativkontrollenöpfchen. Das Endvolumen sollte 20 μL betragen.
- Geben Sie für die biologischen Proben 8 μL jeder DNS-Probe in die Probennöpfchen, entsprechend Ihrer Versuchsplattenanordnung. Das Endvolumen in jeder Vertiefung sollte 20 μL betragen.
- Geben Sie für die beiden Positivkontrollen 8 μL MRSA POS 1 und 8 μL MRSA POS 2 anstelle der DNA-Matrize in die Positivkontrollenöpfchen. Das Endvolumen sollte 20 μL betragen.
- Bedecken und versiegeln Sie die Platte mit einem geeigneten optischen Klebefilm oder mit geeigneten optischen Kappen, bevor Sie mit den qPCR- und Erkennungsschritten fortfahren.
- Legen Sie die Reaktionsplatte in das Echtzeit-PCR- Gerät und führen Sie das qPCR-Protokoll gemäß dem folgenden Abschnitt aus.

9.2. Programmierung der Echtzeit-PCR- Ausrüstung

Die folgende Tabelle zeigt ein Standardprotokoll, das für einige Plattformen optimiert wurde. Diese Bedingungen können jedoch angepasst und validiert werden, um für verschiedene maschinenspezifische Protokolle geeignet zu sein.

ZYKLEN	TEMPERATUR	ZEIT	SCHRITT
1	95 °C	5 min	Polymerase-Aktivierung
45	95 °C	10 s	Denaturierung
	60 °C	30 s	Anlagerung/Verlängerung*

* Wählen Sie je nach qPCR-Ausrüstung die geeigneten Erkennungskanäle aus. Fluorogene Daten sollten während dieses Schritts über die Kanäle FAM, HEX/VIC/JOE, Texas Red/JUN und Cy5 erfasst werden.

Die in diesem Kit verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe und ihre entsprechenden Erkennungskanäle sind die folgenden:

Fluoreszierende Farbstoffe und Erkennungskanäle

ZIELE	FLUORESZIERENDER FARBSTOFF	ERKENNUNGSKANAL
<i>mecA/mecC</i>	FAM™	FAM
<i>SCCmec/orfX</i> Verbindung	HEX™	HEX/VIC/JOE
<i>nuc</i>	Texas Red®	Texas Red/JUN
<i>RNaseP</i>	Cy5™	Cy5
MRSA POS 1	FAM™ und HEX™ & Texas Red® und Cy5™	FAM & HEX/VIC/JOE und Texas Red/JUN Cy5
MRSA POS 2	FAM™ und HEX™ & Texas Red® und Cy5™	FAM & HEX/VIC/JOE und Texas Red/JUN und Cy5

MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, wurde für die folgenden Echtzeit-PCR-Systeme validiert: Applied Biosystems™ 7500 FAST, Applied Biosystems™ QuantStudio 5, Roche Lightcycler® 96 Instrument, Bio-Rad® CFX 96 und Bio-Rad® CFX Opus. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte der Benutzer das Kit mit zuvor charakterisierten Proben (sowohl positiv als auch negativ) validieren.

10. Datenanalyse

10.1. Kriterien für die Laufvalidierung

Vor der Analyse der Ergebnisse empfehlen wir, das Benutzerhandbuch des jeweiligen qPCR-Gerätes zu konsultieren. Überprüfen Sie dann, ob der Echtzeit-PCR-Test gültig ist. Prüfen Sie daher für jede Platte, ob die Ergebnisse der Positiv- und Negativkontrollen gemäß den folgenden Kriterien wie erwartet ausfallen:

Negativkontrolle (keine Matrizenreaktion): Es wird keine Amplifikation festgestellt. Eine Probenkontamination kann aufgetreten sein, wenn die Negativkontrolle Amplifikationskurven (FAM, HEX, Texas Red und Cy5) mit sigmoidaler Form aufweist. Wiederholen Sie den Test nach guter qPCR-Praxis.

Positivkontrolle 1 (MRSA POS 1): Die Amplifikationskurven von FAM (*mecA*), HEX (*SCCmec/orfX*-Verbindung), Texas Red (*nuc*) und Cy5 (RP) sind positiv. Es wird erwartet, dass die positive Kontrolle bei Ct < 32 in den vier Kanälen amplifiziert. Wird dieses Qualitätskontrollkriterium nicht erfüllt, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

Positivkontrolle 2 (MRSA POS 2): Die Amplifikationskurven von FAM (*mecC*), HEX (*SCCmec/orfX*-Verbindung), Texas Red (*nuc*) und Cy5 (RP) sind positiv. Es wird erwartet, dass die positive Kontrolle bei Ct < 32 in den vier Kanälen amplifiziert. Wird dieses Qualitätskontrollkriterium nicht erfüllt, ist dies ein deutlicher Hinweis darauf, dass das Experiment beeinträchtigt wurde.

Wenn die Kontrollen den Erwartungen entsprechen, ist der Test **gültig**. Bitte fahren Sie mit der Interpretation der Ergebnisse für die getesteten Proben fort.

Wenn eine der Kontrollen nicht die erwartete Leistung zeigt, wurde der Test beeinträchtigt oder unsachgemäß durchgeführt und sollte als **ungültig** betrachtet werden.

Bitte wiederholen Sie den Test. Wenn das Problem weiterhin besteht, wenden Sie sich an den Hersteller.

10.2. Interpretation der Testergebnisse

Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, verwendet die folgenden Ct-Grenzwerte für die Ergebnisinterpretation:

CT-WERT	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE
Ct ≤ 37	Erkannt (+) → POSITIV
Ct > 37	Nicht erkannt (-) → NEGATIV

MRSA wird erkannt, wenn die Amplifikationskurven FAM (*mecA / mecC*), HEX (*SCC mec / orfX*-Verbindung) und Texas Red (*nuc*) eine sigmoidale Form mit einem Ct ≤ 37 aufweisen, unabhängig davon, welches Ergebnis für den RP (Cy5)-Test erhalten wird (in diesem Fall ist das Vorhandensein oder Fehlen eines Signals im Cy5-Kanal für die Gültigkeit der verarbeiteten Analyse nicht signifikant).

MRSA wird nicht erkannt, wenn die FAM (*mecA / mecC*) und/oder die HEX (*SCC mec / orfX*-Verbindung) und/oder Texas Red (*nuc*) Kurven nicht amplifizieren oder bei Ct > 37 amplifizieren, während der RP (Cy5) Test eine positive sigmoidale Kurve zeigt (Ct ≤ 45)

Der Test wird ungültig, wenn die drei MRSA-Amplifikationskurven sowie die RP-Amplifikationskurve negativ sind. Der Test sollte mit aus der Probe erneut aufgereinigten Nukleinsäuren wiederholt werden.

Die folgende Tabelle fasst die Interpretation der Hauptergebnisse zusammen (beurteilen Sie die Gesamtform der Amplifikationskurven; **nur sigmoidale Amplifikationskurven zeigen eine echte Amplifikation an**).

<i>mecA/mecC</i> (FAM)	<i>SCCmec/orfX</i> (HEX)	<i>nuc</i> (TexasRed)	RP ¹ (Cy5)	NEGATIVKONTROLLE	POSITIVE KONTROLLEN	INTERPRETATION DER ERGEBNISSE
+	+	+	+/-	-	+	MRSA → POSITIV ²
+	-	+	+/-	-	+	MRSA → NEGATIV ³
-	+	+	+/-	-	+	MRSA → NEGATIV
-	-	+	+/-	-	+	MRSA → NEGATIV
+	-	-	+/-	-	+	MRSA → NEGATIV ⁴
-	+	-	+/-	-	+	MRSA → NEGATIV
+	+	-	+/-	-	+	MRSA → NEGATIV
-	-	-	+	-	+	MRSA → NEGATIV
-	-	-	-	-	+	UNGÜLTIGER TEST ⁵

¹ Eine hohe Konzentration/Beladung an nachweisbarer MRSA-DNS in der Probe kann zu einem reduzierten oder fehlenden internen Kontrollsignal auf dem Cy5-Kanal führen (+: Amplifikationskurve erkannt; -: keine Amplifikationskurve).

² MRSA: Methicillin-resistenter *S. aureus*.

³ Bei Vorliegen einer neuen oder unbekanntenen MRSA-Variante kann der HEX/VIC/JOE-Kanal negativ sein.

⁴ MRCoNs: Koagulase-negativer *Staphylococcus*, der gegen Methicillin/Oxycillin resistent ist.

⁵ Wiederholen Sie die DNS-Extraktion und führen Sie den qPCR-Test erneut durch.

Anmerkung: Bei der Interpretation der Ergebnisse muss die Möglichkeit falsch negativer und falsch positiver Ergebnisse berücksichtigt werden.

- Falsch negative Ergebnisse können verursacht werden durch:
 - Ungeeignete Entnahme, Handhabung und/oder Lagerung der Proben.
 - Zersetzung der Probe.
 - Vorhandensein von qPCR-Inhibitoren.
 - Mutationen im Genom des Erregers; Versäumnis, neue oder unbekanntene Varianten zu erkennen.
 - Nichteinhaltung der in diesem Handbuch beschriebenen Verfahren.
 - Verwendung von nicht validierten Extraktionskits oder Echtzeit-PCR-Plattformen.
- Falsch positive Ergebnisse können verursacht werden durch:
 - Probe, die eine Mischung aus mehreren kommensalen Pathogenen enthält.
 - Aufgrund des Nachweises des Resistenzgens kann eine Mischinfektion aus MSSA (Methicillin-sensitiver *S. aureus*) und CoNS (koagulatnegative Staphylokokken) vorliegen.
 - Kreuzkontamination mit den Positivkontrollen durch unsachgemäße Handhabung.

- Unsachgemäßer Umgang mit Proben, die hohe Konzentrationen an MRSA-DNS enthalten. Aufgrund der hohen Anfälligkeit der qPCR-Methode für Kreuzkontaminationen sollte bei der DNS-Isolierung besondere Sorgfalt walten.
- Unsachgemäße Handhabung des amplifizierten Produkts (qPCR-Platte nach der Amplifikation).
- Das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, kann bei Stämmen von *Staphylococcus argenteus*, einer Koagulase-positiven Spezies der Gattung *Staphylococcus*, die eng mit *S. aureus* verwandt ist und eine SCCmec-Kassette und *mecA* oder *mecC* trägt, zu falsch positiven Ergebnissen führen.

Negative Ergebnisse schließen eine MRSA-Infektion nicht aus und das Testergebnis sollte nicht als alleinige Grundlage für die Behandlung oder andere Entscheidungen zum Patientenmanagement verwendet werden. Außerdem kann dieser Test Erkrankungen durch andere Erreger nicht ausschließen.

11. Bewertung der Leistung

Die Leistung dieses Kits wurde für die in **Abschnitt 9.2** (siehe oben) angegebenen Geräte validiert. Wenn andere Geräte verwendet werden, sollte der Benutzer das Kit mit zuvor charakterisierten Proben (sowohl positiv als auch negativ) validieren.

11.1. Erwartete Ergebnisse

Typische Amplifikationsdiagramme, die für klinische MRSA-negative Nasenabstrichproben (Abbildung 1A) und eine Nasenabstrichprobe von einem Patienten beobachtet wurden, der als Träger von MRSA identifiziert wurde (Abbildung 1B), sind unten dargestellt:

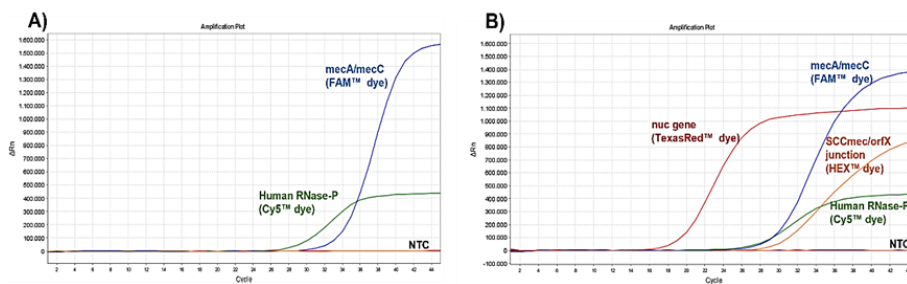


Abbildung 1. Erkennung von *mecA* / *mecC*-, *nuc*-, *SCCmec* / *orfX*-Verbindungsfluoreszenzkurven, die mit dem Pentaplex MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, in klinischen MRSA-negativen Nasenabstrichproben erzeugt wurden, die die *mecA*- und/oder *mecC*-Gene enthalten (Abbildung 1A) und eine Nasenabstrichprobe eines Patienten, der als Träger von MRSA identifiziert wurde (Abbildung 1B). Blaue Kurve: Erkennung von DNS, die die *mecA* / *mecC*-Ziele beherbergt, durch den FAM-Kanal; Rote Kurve: Erkennung von *nuc*-Ziel enthaltender DNS durch den TexasRed-Kanal; Orange Kurve: Erkennung einer DNS, die das SCC *mec* / *orfX*-Verbindungsziel durch den HEX-Kanal beherbergt; Grüne Kurve: Erkennung einer DNS, die das humane RP-Ziel durch den Cy5-Kanal beherbergt.

11.2. Nachweisgrenze (LoD) - Analytische Sensitivität

Die analytische Sensitivität wurde als die niedrigste Konzentration des Analyten definiert, die mit 95%iger Sicherheit zuverlässig nachgewiesen werden konnte. Dies wurde durch das Testen von MRSA-Nukleinsäuren mit unterschiedlichen Kopienzahlen bewertet, die in DNS versetzt wurden, die aus negativen Nasenabstrichproben extrahiert wurde, und in 48 Wiederholungen pro Konzentration von zwei verschiedenen Bedienern unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen unter Standard-Testreaktionsbedingungen getestet wurden. Die Tests wurden über 4 Tage wiederholt. Zusammen ergaben die Daten, dass das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, 0,15 Kopien/ μ L von *mecA*-, *mecC*-, *nuc*- und *SCC-mec* / *orfX*-Verbindungen mit einer Zuverlässigkeit von \geq 95% nachweist. Daher wurde die vorläufige Erkennungsgrenze (LoD) auf 150 Kopien/mL für MRSA festgelegt. Alle Tests wurden unter Verwendung der Applied Biosystems® 7500 FAST Echtzeit PCR-Ausrüstung durchgeführt, und die Analyse wurde unter Verwendung der Software der Ausrüstung durchgeführt.

Die Ergebnisse zeigten eine LoD von 150 Kopien/mL, wenn Nukleinsäuren mit dem NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) extrahiert wurden, und eine LoD von 750 Kopien/mL, wenn die Nukleinsäureextraktion mit chemagischer pathogener NA-gDNA durchgeführt wurde Bausatz H96 (PerkinElmer).

11.3. Analytische Spezifität

11.3.1. Kreuzreaktivität (Ausschluss) und Spezifität

Kreuzreaktivität und Inklusivität wurden *In-silico* bewertet, indem alle im Kit enthaltenen Oligonukleotidsonden und Primer gegen mit MRSA verwandte Krankheitserreger und gegen normale Krankheitserreger, die Infektionen mit ähnlichen Symptomen verursachen, analysiert wurden. Testprimer und -sonden wurden gegen veröffentlichte Genomsequenzen aussortiert. Bei der *In-silico*-Analyse wurde festgestellt, dass das Test-Design MRSA spezifisch nachweist und keine Reaktivität mit nicht verwandten Arten aufwies.

Kreuzreaktivität des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde weiter *In-vitro* evaluiert, indem ein Panel getestet wurde, das aus gut charakterisierten Isolaten von Methicillin-sensitivem *Staphylococcus aureus* (MSSA), Koagulase-negativen *Staphylokokken* (CoNS), eng verwandten Gattungen und anderer pathogener und kommensaler Flora der Nasenlöcher bestand. Die *In-vitro*-Kreuzreaktivität des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, wurde anhand der folgenden Pathogene bewertet: *Bacteroides ovatus*, *Bacteroides thetaiotaomicron*, *Burkholderia vietnamiensis*, *Dickeya dadantii*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium mageritense*, *Mycobacterium smegmatis*, *Nocardia nova*, *Pseudomonas mendocina*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptomyces avermitilis*, *Streptomyces albidoflavus*, *Staphylococcus lugdunensis*, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus dysgalactiae subs equisimilis*, *Streptococcus mitis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Moraxella catarrhalis*, *Haemophilus influenzae*, *Pseudomonas aeruginosa* (PAO1-Stamm) und *Staphylococcus argenteus*. Die Tests wurden mit negativen Nasenproben durchgeführt, die mit genomischer DNS der oben genannten Organismen versetzt waren. Darüber hinaus wurden Nasstests mit sechs inaktiven Proben durchgeführt, die repräsentativ für echte klinische

Humanproben sind, darunter *S. aureus* (MRSA-Krankenhausstamm), *S. aureus* (MRSA-gemeinschaftlichstamm), *S. aureus* (*mecC*), *S. aureus* (MSSA Leere Kassette), *S. aureus* (MSSA) und *Staphylococcus epidermidis* (MSSE HER 1292), der ein CoNS (Zeptomatrix) ist. Alle Tests wurden dreifach unter Verwendung von drei Kit-Chargen durchgeführt. Die Proben wurden unter Verwendung des Thermo Scientific KingFisher Flex Purification System mit dem NZY Mag Viral RNS/DNS Isolationskit, IVD (MD04881) von NZYtech doppelt extrahiert und auf dem Applied Biosystems® 7500 FAST ausgewertet. Keiner der getesteten Erreger ergab ein falsches positives qPCR-Signal.

11.3.2. Störende Substanzen

Die Auswirkungen von 26 potenziell störenden Substanzen, die gelegentlich in den Nasenlöchern verwendet oder in Nasenabstrichproben gefunden wurden, wurden auf mögliche Interferenzen mit dem MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, untersucht. Die Tests wurden mit negativen Nasenproben durchgeführt, die mit MRSA-positiven Proben bei ~2-3x LoD versetzt wurden. Potenzielle Störsubstanzen wurden den künstlichen Proben in Konzentrationen zugesetzt, die den höchsten Konzentrationen entsprechen, die in Proben menschlicher Atemwegspatienten auf der Grundlage von Literaturdaten erwartet werden. Das Experiment wurde über drei Tage durchgeführt. Alle Tests wurden unter Verwendung einer Kit-Charge doppelt durchgeführt und mit Daten verglichen, die mit einem Kontrolltest erhalten wurden, der keine Interferenzen enthielt. Bei den getesteten Konzentrationen zeigten die Ergebnisse, dass keines der getesteten Moleküle die Empfindlichkeit des Nachweises beeinflusste. Die nachstehende Tabelle fasst die bei diesen Experimenten gesammelten Daten zusammen. Die Daten zeigten, dass keine der getesteten Substanzen die Sensitivität des Nachweises von MRSA durch das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, beeinträchtigte.

POTENZIELLE INTERFERENZEN	WIRKSAME BESTANDTEILE	ENDKONZENTRATION IN DER PROBE	INTERFERENZ JA (J) ODER NEIN (N)
Rhinomer® (Isotonisches Meerwasser)	Meerwasser	10% V/V	N
Strepfen® (Rachenspray, orales Anästhetikum & Analgetikum)	Flurbiprofen	5% V/V	N
Vibrocil® (Nasenspüllösung; Allergiespray)	Fluticasonpropionat	5% V/V	N
Nasomet® (Nasaler Kortikosteroid-Spray)	Mometasonfuroat	5% V/V	N
Pulmicort® (Nasaler Kortikosteroid-Spray)	Budesonid	5% V/V	N
Trobex® (antimikrobiell, systemisch)	Trobamycin	10 µg/mL	N
Pyralvex® (Mundschmerzmittel, entzündungshemmend und antiseptisch)	Rhabarberextrakt, Salicylsäure	5% V/V	N
Eludril Gé (Mundspüllösung Antiseptika)	Chlorhexidingluconat, Chlorbutanol-Hemihydrat	5% V/V	N
Isophy® (Kochsalzlösung)	NaCl 0,9%	10%	N
Speichel (Mensch)	-	25% V/V	N
Mucosolvan® (mukolytisch)	Ambroxolhydrochlorid	5% V/V	N
Vollblut (Mensch)	-	4% V/V	N
Bactroban® (Antibiotikum, Nasensalbe)	Mupirocin	5 mg/mL	N
Nasenschleim (Mucin)	Schleim (Mensch)	25% V/V	N
Allergodil® (Nasenspraylösung)	Azelastinhydrochlorid	5% V/V	N
Aeromax nasal® (Nasenspüllösung)	Budesonid	10% V/V	N
Avamys® (Nasenspüllösung)	Fluticasonfuroat	10% V/V	N
Bisolspray Nebulicina® (Nasenspüllösung)	Oxymetazolinhydrochlorid	10% V/V	N
Mometasona Generis® (Nasenspüllösung)	Mometason	5% V/V	N
Nasorhinathiol® (Nasenspüllösung)	Oxymetazolinhydrochlorid	10% V/V	N
Rhinomer intense Eucalyptus® (Nasenspüllösung)	hypertonisches Meerwasser mit ätherischem Eukalyptusöl	10% V/V	N
Vibrocil Actilong® (Nasenspüllösung)	Xylometazolinhydrochlorid	10% V/V	N
Tamiflu® (Antivirales Medikament)	Oseltamivir	5% V/V	N
Neo-Sinefrina® (Nasenspüllösung)	Phenylephrinhydrochlorid	10% V/V	N
Neo-Sinefrina Alergo® (Nasenspüllösung)	Beclomethasondipropionat	10% V/V	N
Prednifalmina® (Augensalbe)	Prednisolon und Chloramphenicol	10% V/V	N
Kontrolle ohne störende Substanzen	H ₂ O	5% V/V	N

11.4. Präzision

Die Testpräzision für das MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde durch wiederholtes Testen positiver Proben bestimmt, die zwei bakterielle Belastungsniveaus darstellen, 3x LoD- und 30x LoD-Kopien pro Reaktion, die mit DNA versetzt wurden, die aus negativen Nasenabstrichproben extrahiert wurde, unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen und folgenden typischen Testreaktionsbedingungen. Die Präzision wurde durch Messung des C_q-Mittelwerts, des C_q-Variationskoeffizienten und des prozentualen Anteils der Wiederholungserkennung bewertet, wie unten für jeden Fall beschrieben. Die Daten sind in der untenstehenden Tabellen zusammengefasst.

Präzision des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, bei Erkennung des *mecA*-Zielgens

VARIABLE GETESTET		<i>mecA</i> (KOPIEN/REAKTION)	
		3x LoD	30x LoD
WIEDERHOLBARKEIT	n	18	18
	Mittlerer Cq	35,77	32,88
	Variationskoeffizient (%)	2,01	1,19
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	72	72
	Mittlerer Cq	36,05	33,04
	Variationskoeffizient (%)	2,56	1,22
	% Replikat-Erkennung	98,61	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN CHARGEN	n	126	126
	Mittlerer Cq	36,07	33,06
	Variationskoeffizient (%)	2,14	1,10
	% Replikat-Erkennung	99,21	100
BEDIENER-REPRODUZIERBARKEIT	n	36	36
	Mittlerer Cq	36,35	33,18
	Variationskoeffizient (%)	1,51	1,14
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	90	90
	Mittlerer Cq	35,93	32,92
	Variationskoeffizient (%)	2,19	1,23
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, bei Erkennung des *mecC*-Zielgens

VARIABLE GETESTET		<i>mecC</i> (KOPIEN/REAKTION)	
		3x LoD	30x LoD
WIEDERHOLBARKEIT	n	18	18
	Mittlerer Cq	35,56	33,02
	Variationskoeffizient (%)	2,57	0,95
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	72	72
	Mittlerer Cq	35,68	33,07
	Variationskoeffizient (%)	2,54	1,40
	% Replikat-Erkennung	97,22	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN CHARGEN	n	126	126
	Mittlerer Cq	35,88	33,17
	Variationskoeffizient (%)	2,53	1,40
	% Replikat-Erkennung	97,62	100
BEDIENER REPRODUZIERBARKEIT	n	36	36
	Mittlerer Cq	36,25	33,33
	Variationskoeffizient (%)	2,10	1,62
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	90	90
	Mittlerer Cq	35,80	32,91
	Variationskoeffizient (%)	2,41	1,24
	% Replikat-Erkennung	98,89	100

Präzision des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, bei-Erkennung des *nuc S. aureus*-Zielgens

VARIABLE GETESTET		<i>nuc</i> (KOPIEN/REAKTION)	
		3x LoD	30x LoD
WIEDERHOLBARKEIT	n	18	18
	Mittlerer Cq	35,63	32,76
	Variationskoeffizient (%)	2,03	1,09
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	72	72
	Mittlerer Cq	35,68	32,88
	Variationskoeffizient (%)	2,29	1,41
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN CHARGEN	n	126	126
	Mittlerer Cq	35,96	32,99
	Variationskoeffizient (%)	2,48	1,44
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER REPRODUZIERBARKEIT	n	36	36
	Mittlerer Cq	36,28	33,22
	Variationskoeffizient (%)	2,33	1,32
	% Replikat-Erkennung	100	100

REPRODUZIERBARKEIT	n	90	90
ZWISCHEN INSTRUMENTEN	Mittlerer Cq	35,63	32,65
	Variationskoeffizient (%)	2,36	1,23
	% Replikat-Erkennung	100	100

Präzision des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech, bei Erkennung des SCCmec/orfX-Verbindungsziel

VARIABLE GETESTET		SCCmec/orfX VERBINDUNG	
		3x LoD	30x LoD
WIEDERHOLBARKEIT	n	18	18
	Mittlerer Cq	36,09	33,27
	Variationskoeffizient (%)	1,44	0,77
	% Replikat-Erkennung	100	100
TÄGLICHE REPRODUZIERBARKEIT	n	72	72
	Mittlerer Cq	36,25	33,33
	Variationskoeffizient (%)	2,04	1,16
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN CHARGEN	n	126	126
	Mittlerer Cq	36,33	33,36
	Variationskoeffizient (%)	1,96	1,18
	% Replikat-Erkennung	100	100
BEDIENER REPRODUZIERBARKEIT	n	36	36
	Mittlerer Cq	36,54	3,39
	Variationskoeffizient (%)	1,82	1,09
	% Replikat-Erkennung	100	100
REPRODUZIERBARKEIT ZWISCHEN INSTRUMENTEN	n	90	90
	Mittlerer Cq	35,26	32,18
	Variationskoeffizient (%)	4,03	3,89
	% Replikat-Erkennung	100	100

11.4.1. Wiederholbarkeit

Die Wiederholbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 18 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) bewertet, was einer endgültigen Anzahl von 36 durchgeführten Tests pro Ziel entspricht.

11.4.2. Tägliche Reproduzierbarkeit

Die tägliche Reproduzierbarkeit wurde von einem Bediener durch die Analyse von 72 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD-Kopien pro Reaktion) über 4 Tage hinweg bewertet, wobei 18 Wiederholungen jeder Konzentration pro Tag durchgeführt wurden (insgesamt wurden 144 Tests pro Ziel durchgeführt).

11.4.3. Reproduzierbarkeit von Charge zu Charge

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Chargen wurde von einem Anwender durch die Analyse von 126 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen mit 84 Wiederholungen pro Charge bewertet.

11.4.4. Reproduzierbarkeit durch den Bediener

Die Reproduzierbarkeit durch den Bediener wurde durch Testen von 36 Replikaten jeder Probe (3x LoD- und 30x LoD-Kopien pro Reaktion) durch drei verschiedene Bediener mit 12 Replikaten pro Bediener bewertet, was insgesamt 24 Replikationen pro Bediener unter Verwendung von 3 verschiedenen Kit-Chargen ergibt.

11.4.5. Reproduzierbarkeit zwischen den Instrumenten

Die Reproduzierbarkeit zwischen den Geräten wurde von einem Bediener durch Testen von 90 Wiederholungen jeder Probe (3x LoD und 30x LoD Kopien pro Reaktion) in fünf verschiedenen qPCR-Geräten in insgesamt 36 Tests pro Gerät gemessen.

HERSTELLER VON ECHTZEIT-PCR-GERÄTEN	ECHTZEIT-PCR-PLATTFORMMODELL
Applied Biosystems®	7500 Fast
	QuantStudio™ 5
Roche®	LightCycler™ 96 instrument
Bio-Rad®	CFX Opus 96 Real-Time PCR
	CFX96 Touch Real-Time PCR

11.5. Klinische Bewertung

Die klinische Leistung des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech wurde anhand von 157 Nasenabstrichproben bewertet, die zuvor mit routinemäßiger mikrobiologischer Kultur charakterisiert wurden. Nukleinsäuren wurden mit dem NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) extrahiert und dann mit dem MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, amplifiziert. Die Daten zeigten, dass 98,28% der klinischen Sensitivität (PPA) und 74,75% der klinischen Spezifität (NPA) für alle getesteten positiven und negativen Proben erreicht wurden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von MRSA mit dem MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech.

MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD	VERGLEICHSTEST		
	MRSA-positiv	MRSA-negativ	Gesamt
	MRSA-positiv	57	25*
MRSA-negativ	1	74	75
Gesamt	58	99	157

PPA (Positive prozentuale Übereinstimmung): 98,28% für MRSA

NPA (Negative prozentuale Übereinstimmung): 74,75% für MRSA

* Eine mögliche Erklärung für diese negativen Kulturproben ist der Verlust der Bakterienlebensfähigkeit während der Probenentnahme und/oder des Transports, wenn die nicht lebensfähige Bakterien-DNS für die Amplifikation verfügbar blieb. Darüber hinaus kann dieser Unterschied damit begründet werden, dass die qPCR-Technik sensitiver ist als Kulturmethoden.

Darüber hinaus wurde auch ein Vergleich der klinischen Leistung des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, und eines Real-time PCR-Vergleichstests durchgeführt. Die Daten zeigten, dass für alle getesteten positiven und negativen Proben 97,22% der Übereinstimmungen hinsichtlich der klinischen Sensitivität (PPA) und 92,12% der klinischen Spezifität (NPA) erreicht wurden.

MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD	VERGLEICHSTEST REAL-TIME QPCR KIT		
	MRSA-positiv	MRSA-negativ	Gesamt
	MRSA-positiv	35	23
MRSA-negativ	1	269	270
Gesamt	36	292	328

PPA (Positive prozentuale Übereinstimmung): 97,22% für MRSA

NPA (Negative prozentuale Übereinstimmung): 92,12% für MRSA

Darüber hinaus wurde die klinische Leistung des Kits bei Verwendung einer alternativen Nukleinsäureextraktionsmethode, nämlich des chemagischen pathogenen NA gDNA Kit H96 (PerkinElmer), bewertet. Die Daten ergaben einen PPA-Wert von 91,1% und einen NPA-Wert von 98,0% im Vergleich zum Nachweis von Nukleinsäuren, die mit dem NZY Mag Viral RNA/DNA Isolation Kit, IVD (MD0488, NZYtech) extrahiert wurden. Insgesamt zeigen die Ergebnisse eine hohe Sensitivität und Spezifität beim Nachweis von MRSA mit dem MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech.

12. Qualitätskontrolle

Alle Komponenten des MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD, von NZYtech werden gemäß den oben beschriebenen Protokollen getestet. Das Pentaplex-Echtzeit-PCR-System ermöglicht den Nachweis von Zielen, die für die Identifizierung von MRSA-DNS und humaner RNase P-DNS beschrieben wurden. Positive Amplifikationen werden für Zielgene, Positivkontrollen und interne Kontrollen durch Texas Red/JUN-, FAM-, HEX/VIC/JOE- und Cy5-Kanäle gemäß den jeweiligen Primer/Sondensatz-Reporterfarbstoffen beobachtet.







13. Technische Unterstützung

Für technische Unterstützung wenden Sie sich bitte an unser engagiertes technisches Support-Team unter der Telefonnummer: +351 (0) 21 364 35 14 oder per E-Mail: info@nzytech.com.

14. Markenzeichen und Haftungsausschlüsse

Alle Marken, die in diesem Handbuch erscheinen, sind Eigentum der jeweiligen Inhaber.

15. Erläuterung von Symbolen

IVD	<i>In-vitro</i> -Diagnostisches Medizinprodukt		Gebrauchsanweisung beachten
REF	Katalognummer		Hersteller
LOT	Chargen-Code		Verwendet von
	Temperaturgrenzen		Ausreichend für
CONTROL +	Positivkontrolle		Vor Sonnenlicht fernhalten (Primer-/Sonden-Mix)
CONTROL -	Negativkontrolle		

16. Konformitätserklärung

Produktname: MRSA Multiplex Real-time PCR Kit, IVD

Katalognummer: MD04931

Verwendungszweck: qualitativer MRSA-Erkennung

Einstufung: Andere (nicht abgedeckt durch Anhang II oder nicht zum Eigenanwendung bestimmt) laut der Richtlinie 98/79/EG.

Hersteller: NZYtech - Gene & Enzyme,

Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar

Edifício E, R/C,

1649-038, Lisboa

Portugal

Wir, NZYtech, Lda – Genes & Enzymes, erklären hiermit, dass dieses Produkt, auf das sich diese Konformitätserklärung bezieht, mit den folgenden Normen und anderen normativen Dokumenten ISO 9001:2015 und ISO 13485:2016 gemäß den Bestimmungen der Richtlinie 98/79/EG und der Verordnung (EU) 2017/746 über In-vitro-Diagnostika, wie sie in nationales Recht der Mitgliedstaaten der Europäischen Union umgesetzt wurde, konform ist.

Die technische Dokumentation wird gepflegt bei NZYtech, Estrada do Paço do Lumiar, Campus do Lumiar - Edifício E, R/C, 1649-038 Lisboa, Portugal.



Joana Brás, PhD

Technische Direktorin

17. Referenzen

- Wertheim, H. F. et al. (2005). The role of nasal carriage in *Staphylococcus aureus* infections. *Lancet Infect. Dis.* 5, 751–762.
- Van Belkum A, Rochas O (2018) Laboratory based and point-of-care testing for MSSA/MRSA detection in the age of whole genome sequencing. *Front Microbiol* 9:1437. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01437>
- Faoagali, J. L. et al. (1992). Ten years' experience with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a large Australian hospital. *J. Hosp. Infect.* 20, 113–119.
- Voss, A. et al. (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11, 1965-1966.
- Weltgesundheitsorganisation. (2009) WHO-Richtlinien zur Händehygiene im Gesundheitswesen. Weltallianz für Patientensicherheit (WHO Press, Genf).
- Lee, A. et al. (2018). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nat Rev Dis Primers* 4, 18033. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.33>
- Jonas D, et al. (2002). Rapid PCR-based identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening swabs. *J Clin Microbiol.* 40(5):1821-3.
- Internationale Arbeitsgruppe zu den Staphylokokken-Kassetten-Chromosomenelementen (2011). http://www.sccmec.org/Pages/SCC_HomeEN.html.
- Meng, X et al. (2020). 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.* 11. Jg.
- Dupieux C., et al. (2017). Detection of *mecC* -positive *Staphylococcus aureus*: what to expect from immunological tests targeting PBP2a? *J Clin Microbiol* 55(6):1961–1963.
- Padmanabhan RA, Fraser TG. (2005). The emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in the community. *Cleveland Clinic J Med.* 72(3):235–241.

