

Onar®MRSA

Methicillin resistant *Staphylococcus aureus*

Diagnostic Kit for qPCR

Inhaltsverzeichnis

1. Produkthinweise	2
1.1 Enthaltene Reagenzien	2
1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien	2
1.3 Benötigte Materialien	2
2. Anwendungsgebiete und Testprinzip	3
3. Durchführung	3
3.1 Gewinnung des Probenmaterials	3
3.2 Rehydratisierung der Reagenzien	4
3.3 Programmierung und Auswertung	4
3.3.1 LightCycler® 2.0	4
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)	6
3.3.3 ABI 7500	6
3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)	8
3.5 Interpretation der Ergebnisse	8
4. Fehleranalyse	8
5. Produktspezifikationen	8

Contents

1. General Advice	9
1.1 Test Kit Components	9
1.2 Stability and Storage	9
1.3 Supplemental Requirements	9
2. Application and Test Principle	10
3. Test Protocol	10
3.1 Preparation of Sample Material	10
3.2 Rehydration of the Reagents	10
3.3 Experimental Protocol and Result Reading	11
3.3.1 LightCycler® 2.0	11
3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)	12
3.3.3 ABI 7500	13
3.4 PCR Master Mix Setup	14
3.5 Result Interpretation	14
4. Trouble Shooting	15
5. Product Specifications	15

1. Produkthinweise

Bitte verwenden Sie das Produkt und Einzelkomponenten nicht mehr nach Ablauf der Haltbarkeit. Verwerfen Sie bitte überschüssige Einzelkomponenten.

Dieser Kit erzielt exzellente Ergebnisse mit unserer MB Taq DNA-Polymerase (Cat # 53-0050/100/200/250). Bei der Verwendung anderer Polymerasen kann keine umfassende Leistungsfähigkeit garantiert werden. Gerne senden wir Ihnen auf Anfrage ein kostenloses Testmuster der MB Taq (10 Units) zu.

Onar[®]MRSA ist in bedarfsorientierten Packungsgrößen erhältlich:

Cat.-No. 22-2025	25 Tests	1 x 25 Reaktionen
Cat.-No. 22-2100	100 Tests	4 x 25 Reaktionen
Cat.-No. 22-2250	250 Tests	10 x 25 Reaktionen
Cat.-No. 22-2101	100 Tests	Hochdurchsversion mit 100 Reaktionen je Röhrchen

1.1 Enthaltene Reagenzien

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	roter Verschluss
Primer, Sonden und Desoxynukleotidtriphosphate dATP, dCTP, dGTP und dUTP, portioniert für 25 Tests, lyophilisiert	
<i>Rehydration Buffer</i>	blauer Verschluss
Rehydratisierungspuffer, 1,8 ml	
<i>Positive Control DNA</i>	grüner Verschluss
DNA-Fragmente des Methicillin-resistenten <i>Staphylococcus aureus</i> , mittels PCR hergestellt, nicht infektiös, 300 µl in Tris/HCl, lyophilisiert	
<i>Internal Control DNA</i>	gelber Verschluss
Interne Kontrolle, Plasmid-DNA, 300µl in Tris/HCl, lyophilisiert	
<i>PCR grade Water</i>	weißer Verschluss
Wasser für Negativkontrollen, 2 ml	

1.2 Lagerung und Stabilität der Reagenzien

Alle Reagenzien werden bei Raumtemperatur versendet und müssen bei +2 °C bis +8 °C gelagert werden. Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* ist lichtgeschützt aufzubewahren. Häufiges Auftauen und Einfrieren der Reagenzien sollte vermieden werden. Werden wenige Proben regelmäßig getestet, sollten die Kontrollen und der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* aliquotiert und eingefroren werden. Bei vorschriftsmäßiger Lagerung ist der Kit bis zu dem im Produktzertifikat (das Produktzertifikat finden Sie auf unserer Webseite) angegebenen Datum haltbar.

1.3 Benötigte Geräte und Materialien

- qPCR-Gerät
- geeignete PCR-Reaktionsgefäße
- Mikrozentrifuge, Mikroliterpipetten und Filterspitzen (1 - 1000 µl)
- DNA-Polymerase (1 Unit/Test)

2. Anwendungsgebiete und Testprinzip

Onar[®]MRSA ist eine *in vitro* Testsystem zur quantitativen Diagnostik des Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) in klinischen Proben. Der Test basiert auf dem Prinzip der Polymerase-Kettenreaktion. Die mitgelieferten Primer sind für das *mecA*-Gen des MRSA spezifisch. Dieses Gen kodiert die Methicillin-Resistenz in *Staphylococcus aureus*, kommt jedoch auch in den Spezies *S. epidermidis*, *S. intermedius* und *S. pseudointermedius* vor. Innerhalb des amplifizierten Produktes bindet eine spezifische Sonde, deren Fluoreszenzsignal bei 520 nm die Amplifikation eines *mecA*-Genabschnitts anzeigt. Zur Bestätigung eines „echten“ MRSA enthält das Testsystem eine weitere Sonde, die spezifisch für das *Staphylococcus aureus* Gen *femA* ist. Diese Sonde liefert ein Fluoreszenzsignal bei einer Wellenlänge von 610 nm.

Das Testsystem beinhaltet außerdem DNA, die als Interne Amplifikationskontrolle zur Überprüfung der PCR-Effizienz den PCR-Ansätzen direkt oder bereits zur Probe vor DNA-Extraktion zur Überprüfung des kompletten Analyseprozesses hinzugegeben werden kann. Die Amplifikation der internen Kontrolle wird mit einer weiteren Sonde bei 560 nm detektiert. Dadurch können falsch-negative Ergebnisse, z.B. durch Inhibition, ausgeschlossen werden.

Der *Primer/Probe/Nucleotide Mix* enthält serienmäßig dUTP statt dTTP. Kontaminationen durch Amplifikate aus vorangegangenen Analysen können durch die Verwendung des hitzestabilen Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UNG) im PCR-Ansatz bedingt beseitigt werden. UNG ist nicht Bestandteil von Onar[®]MRSA.

3. Durchführung

3.1 Gewinnung des Probenmaterials

Als Untersuchungsmaterialien eignen sich Abstriche aller klinisch relevanten Ausgangspunkte für Infektionen. Vor allem intertriginöse Hautbereiche, Atemwegsekrete, Wundsekrete, bei Bakteriämien auch Blut sowie medizinische Geräte können nach Abstrich oder nach vorhergehender Kultivierung auf den entsprechenden Selektivnährböden analysiert werden. Zur Entnahme der Proben sollten sterile, trockene Tupfer ohne Medium verwendet werden (vorzugsweise Darcran[®] oder andere synthetische Gewebe). Zur Probenvorbereitung ist grundsätzlich eine DNA-Extraktion mit einem DNA-Extraktionskit (MB DNA Extraction Kit Cat # 56-1100) erforderlich, um Inhibitoren der PCR sicher zu entfernen und eine Konzentrierung der *Staphylococcus aureus*-DNA zu erreichen. Der enthaltene DNA-Extrakt kann direkt für den Onar[®]MRSA eingesetzt werden. Die Probe sollte eine Gesamt-DNA-Last von maximal 100 µg/ml nicht überschreiten. Eine Lagerung der Extrakte bei mindestens -18°C über einen Zeitraum von einem Jahr ist möglich. Wiederholtes Einfrieren und Auftauen oder eine Lagerung im Kühlschrank für mehr als 12 Stunden sollte vermieden werden. Die hohe Empfindlichkeit der PCR-Methode erhöht die Gefahr falsch-positiver Ergebnisse, z.B. durch Kreuzkontaminationen oder unsauberes Arbeiten. Alle Arbeiten sollten unter Beachtung der geltenden Laborregeln durchgeführt werden.

3.2 Rehydratisierung der Reagenzien

1. Lyophilisate für 5 Sekunden bei max. Umdrehung der Tischzentrifuge zentrifugieren
2. Zugabe von 365 µl Rehydratisierungspuffer zum *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
3. Zugabe von 300 µl *PCR-grade Water* zur *Internal Control DNA* und zur *Positive Control DNA*
3. 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubieren
4. DNA kurz vortexen und für wenige Sekunden zentrifugieren

 **Nach erfolgter Rehydratisierung müssen die Reagenzien gekühlt gehalten und bei mindestens -18 °C gelagert werden.**

3.3 Programmierung und Auswertung

Programme für verschiedene real-time PCR-Geräte werden auf unser Homepage angeboten.

3.3.1 LightCycler® 2.0

Programmschritt 1: Vorinkubation

Zyklen	1
Analysemodus	None
Temperaturprofil [°C]	Segment 1
<hr/>	
Zieltemperatur [°C]	95
Inkubationszeit [min]	2:00
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None



LightCycler® 2.0:

Bitte achten Sie bei der Programmierung auf die Einstellung der „Seek Temperature“, diese sollte auf mindestens 90°C eingestellt sein.

Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen	45
Analysemodus	Quantifikation

Temperaturprofil [°C]	Segment 1	Segment 2	Segment 3	Segment 4
Zieltemperatur [°C]	95	55	60	72
Inkubationszeit [s]	0	5	7	5
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0	0	0	0
Temperaturschritte [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0	0	0	0
Fluoreszenzmessung	None	None	Single	None



Segment 3 darf nicht weggelassen werden!

Programmschritt 3: Kühlung

Zyklen	1
Analysemodus	None
Temperaturprofil [°C]	Segment 1
Zieltemperatur [°C]	40
Inkubationszeit [s]	30
Temperaturanstiegsrate [°C/s]	20.0
zweite Zieltemperatur [°C]	0
Temperaturschritte [°C]	0.0
Verzögerung [Zyklen]	0
Fluoreszenzmessung	None

Die Dauer der Vorinkubation bei 95 °C ist von der verwendeten Polymerase abhängig. Bei anderen Hot-Start-Enzymen muss die Vorinkubation zur Aktivierung entsprechend verlängert werden. Bitte entnehmen Sie die Dauer dem Beipackzettel Ihrer Polymerase.

Auswertung der Rohdaten:

- Es erfolgt zunächst die Auswahl der Fluoreszenzkanäle Channel 1, 2 und 3.
- Zu Darstellung der Amplifikationskurven und den probenspezifischen *ct*-Werten wird auf *Quantification* geklickt.
- Der Threshold wird von der Software automatisch gelegt.
- Amplifikationskurven ohne signifikanten Anstieg sind als negativ zu werten.

Target	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Interne Kontrolle
Kanäle bei LC 2.0	Channel 1 (530)	Channel 3 (610)	Channel 2 (560)

3.3.2 Rotorgene 6000 (5-plex)

Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min



Bitte achten Sie vor dem Start des Laufes auf die korrekte Filterauswahl:

Target *mecA*: Green (470-510 nm)
Target *femA*: Orange (585-610 nm)
Interne Kontrolle: Yellow (530-555 nm)

Programmschritt 2: Amplifikation

Einstellung	Cycling
Zyklen	45
Denaturierung	95 °C für 5 sek
Annealing	55 °C für 10 sek —> Datenerfassung (Filter Green, Orange und Yellow)
Extension	72°C für 7 sek
Gain	automatisch (auto Gain)
Slope Correct	aktiviert
Ignore First	deaktiviert

Auswertung der Rohdaten:

Target	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Interne Kontrolle
Kanal	green	orange	yellow

- Öffnen des Fensters *Analysis*
- Auswahl des Reiters *Quantitation*
- Auswahl des jeweiligen Kanals (green, orange oder yellow)
- Starten der Analyse durch doppeltes Anklicken.
- Es öffnen sich folgende Fenster:
 - Quantitation Analysis - Cycling A* (green, orange oder yellow)
 - Quant. Results - Cycling A* (green, orange oder yellow)
 - Standard Curve - Cycling A* (green, orange oder yellow)
- Im Fenster *Quantitation Analysis* erst *inear scale* und dann *slope correct* wählen
- Einstellung des Threshold*:
 - Im Fenster *CT Calculation* den Threshold setzen (Wert 0-1)
 - Thresholdlinie in Grafik plazieren. Die Thresholdlinie sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Im Fenster *Quant. Results* können die *ct*-Werte abgelesen werden.
- Proben, die keine *ct*-Werte zeigen sind als negativ zu werten.

*entfällt wenn eine Standardreihe mitgeführt und *Autothreshold* angewählt wurde.

3.3.3. ABI 7500

Detektoreinstellungen:

für die MRSA (<i>mecA</i>) Target-DNA Sonde:	Reporter - FAM	Quencher - none
für die <i>S. aureus</i> (<i>femA</i>) Target-DNA Sonde:	Reporter - ROX	Quencher - none
für die Interne Kontroll-Sonde:	Reporter - VIC	Quencher - none



Die ROX-Referenz-Funktion muss ausgeschaltet sein. Alle drei Detektoren müssen für jedes verwendete Reaktionsgefäß aktiviert werden. Fluoreszenzmessung während der Extension.

Programmschritt 1: Vorinkubation

Einstellung	Hold
Zieltemperatur	95 °C
Inkubationszeit	3:00 min

Programmschritt 2: Amplifikation

Zyklen	45
Einstellung	Cycle
Denaturierung	95 °C für 30 sek
Annealing	55 °C für 30 sek
Extension	60 °C für 45 sek

Auswertung der Rohdaten:

- Die ersten Grundeinstellungen erfolgen in der rechten Funktionsleiste:
 - Data: Delta RN vs. Cycle
 - Detector: FAM, ROX, VIC
 - Line Color: Well Color

- Mit der rechten Maustaste öffnet sich ein neues Fenster, dort erfolgt die Einstellung der *Graph settings*
 Folgende Einstellungen sollten dort angewählt und im Anschluß mit *ok* bestätigt werden:
 Real Time Settings: Linear
 Y-Axis Post Run Settings: Linear und Auto Scale
 X-Axis Post Run Settings: Auto Scale
 Display Options: 2
- Zur Berechnung der *ct*-Werte und deren Darstellung im Report bitte auf *Analyze* klicken.
- Der Threshold sollte an den Anfang des linearen Bereichs der Positivkontrolle gelegt werden.
- Proben ohne ausgewiesenen *ct*-Wert sind als negativ zu werten.

Target	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Interne Kontrolle
Kanal	FAM	ROX	VIC

3.4 Ansatz des PCR-Reaktionsmixes (Mastermix)

Das Gesamtvolumen des Ansatzes für eine Reaktion beträgt 25 μl . Für jede Testreihe muss eine Negativkontrolle (NK) und eine Positivkontrolle (PK) mitgeführt werden. Der Mastermix wird in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß angesetzt und vorsichtig gemischt.

	für 1 Reaktion	für 25 Reaktionen
<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix</i>	14,0 μl	350,0 μl
<i>Internal Control DNA</i>	1,0 μl	25,0 μl
Polymerase (5 U/ μl)	0,2 μl	5,0 μl
Gesamtvolumen	15,2 μl	380,0 μl



Zwischen der Herstellung des Mastermixes und dem Starten der PCR dürfen nicht mehr als 45 Minuten vergehen, da es sonst zu einer Verringerung der Fluoreszenzausbeute kommt.

Der Mastermix wird á 15 μl auf die PCR-Reaktionsgefäße verteilt. Der Überschuss (1 μl) an Mastermix wird verworfen.

Den einzelnen PCR-Gefäßen wird entweder als Negativkontrolle 10 μl PCR-Wasser oder der Elutionspuffer der DNA-Extraktion bzw. 10 μl Probe bzw. 10 μl Positivkontrolle hinzugefügt. Diese Pipettierreihenfolge sollte eingehalten und die Reaktionsgefäße nach jedem Pipettieren sofort geschlossen werden. Der Ansatz wird kurz zentrifugiert, die Reaktionsgefäße in den Thermocycler gestellt und das Thermocycler-Programm gestartet.

Mastermix	15,0 μl
Template DNA/ NK oder PK	10,0 μl
kompletter PCR-Ansatz	25,0 μl

3.5 Interpretation der Ergebnisse

Die Präsenz von MRSA in der Probe wird durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals für *mecA* angezeigt. Ein Anstieg des Fluoreszenzsignal in Kanal für *femA* zeigt die Präsenz eines *S. aureus* und bestätigt damit MRSA in der Probe. Bei Verwendung der Internen Kontrolle wird eine fehlerfreie PCR durch einen Anstieg des Fluoreszenzsignals im Kanal für die Interne Kontrolle angezeigt. Die Interne Kontrolle ist so gering dosiert, dass sie bei großen Mengen an MRSA in der Probe nicht mehr amplifiziert wird. Eine erfolgreiche PCR ist dann durch das Signal im Kanal für *mecA* oder *femA* erkennbar.

mecA PCR	femA PCR	Interne Kontrolle	Interpretation
positiv	positiv	irrelevant	MRSA oder MRCoNS* mit MSSA
positiv	negativ	irrelevant	MRCoNS
negativ	positiv	irrelevant	MSSA
negativ	negativ	negativ	Inhibition der PCR
negativ	negative	positiv	MRSA negativ

4. Fehleranalyse

Zur Fehleranalyse sollten zuerst das Thermocycler-Programm sowie das Pipettierschema überprüft werden. Anschließend empfiehlt sich die Durchführung von Probeläufen mit einer Positiv- und einer Negativkontrolle. Bei Verwendung anderer DNA-Polymerasen als der empfohlenen sind die unter Punkt 1 aufgeführten Hinweise zu beachten. Die Konzentration der Polymerase kann dabei auf bis zu 2,5 U/Reaktion erhöht werden. Bitte beachten Sie, dass sich das gesamte Pipettierschema verändert. Findet bei den Kontrollansätzen keine Amplifikation statt, kann dies folgende Ursachen haben:

- Aktivität der verwendeten Polymerase nicht ausreichend oder Enzym nicht kompatibel mit Kitpuffer
- Programmier- oder Pipettierfehler
- Probenelutionspuffer nicht für die Komplettierung der Negativkontrollen verwendet

5. Produktspezifikationen

<i>Verwendung</i>	Nachweis von DNA Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) in klinischen Proben
<i>Regulatorischer Status</i>	CE-markiert gemäß IVD Direktive 98/79/EC, Annex II für den vollständigen Prozess
<i>Analytische Sensitivität</i>	Nachweis von weniger als 10 MRSA-Partikel je Probe
<i>Analytische Spezifität</i>	Nachweis aller bekannten SCCmec-Mutanten. Keine Kreuzreaktivität mit kommensalisch auftretenden Mikroorganismen des Mund- und Rachenbereichs sowie der Haut, mit anderen Staphylokokken (inklusive <i>S. epidermidis</i> , <i>S. intermedius</i> und <i>S. pseudointermedius</i>) oder Pneumoniereagern wie z.B. <i>Legionella pneumophila</i> oder <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Diagnostische Spezifität</i>	98,6 % (1022 Abstrichproben, Testung gegen Chromagar als Goldstandard)
<i>Diagnostische Sensitivität</i>	86,7 % (1022 Abstrichproben, Testung gegen Chromagar als Goldstandard)
<i>Detektionsbereich</i>	5 bis 5×10^6 Genome/Reaktion
<i>Quantifizierungsbereich</i>	Bei Anwendung des <i>MB DNA Extraction Kits</i> 150 bis 5×10^6 Genome/Test

1. Reagents and Materials

Please do not use the product after the date of expiry. Discard remaining reagents.

The test provides excellent results with MB Taq DNA Polymerase (Cat # 53-0050/0100/0200/0250). We can neither guarantee a high level of sensitivity nor compatibility with other polymerases. If you intend to test our MB Taq DNA Polymerase in parallel with your in-house polymerase, please feel free to contact us and get a gratis MB Taq sample (10 units).

Onar[®]MRSA is available in tailored package sizes:

Cat.-No. 22-2025	25 tests	1 x 25 reactions
Cat.-No. 22-2100	100 tests	4 x 25 reactions each
Cat.-No. 22-2250	250 tests	10 x 25 reactions each
Cat.-No. 22-2101	100 tests	high throughput (HT) version with 100 reactions per tube

1.1 Test Kit Components

<i>Primer/Probe/Nucleotide Mix (PPN mix)</i>	red cap
Primer set, probes and deoxynucleotide triphosphates dATP, dCTP, dGTP and dUTP, aliquoted for 25 reactions, lyophilized	
<i>Rehydration Buffer</i>	blue cap
1.8 ml	
<i>Positive Control DNA</i>	green cap
Fragment of methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> DNA, prepared by PCR, non-infectious, 300 µl in Tris/HCl, lyophilized	
<i>Internal Control DNA</i>	yellow cap
Plasmid DNA, non-infectious, 300 µl in Tris/HCl, lyophilized	
<i>PCR grade Water</i>	white cap
water for no-template controls, 2 ml	

Please find the guarantee certificate and the conformity declaration on our website.

1.2 Stability and Storage

Kit components are stable during shipping. Upon receipt, store at +2°C to +8°C. After rehydration of the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* store below -18°C and avoid repeated freezing and thawing. Protect the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* from light. For repeated testing of low sample numbers, the *Primer/Probe/Nucleotide Mix* and the controls should be aliquoted. By following these recommendations, the kit is stable until the expiration date stated on the box label.

1.3 Supplemental Requirements

- qPCR machine
- corresponding PCR reaction tubes
- microcentrifuge, micropipettes and filtered tips (1 - 1000 µl)
- polymerase

2. Application and Test Principle

The Onar[®]MRSA is an in vitro test for semi-quantitative and rapid PCR-based detection of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in clinical samples. This one-step triplex test system is a CE-marked IVD and approved for in vitro clinical diagnostics.

The test can basically be used with all relevant PCR machines with filters for the detection of 520, 560 and 610 nm. The supplied primer, probes and the positive control are specific for a segment of the *mecA* gene of the methicillin resistance encoding gene and the *Staphylococcus aureus* verification gene *femA* as *mecA* is also present in other non-pathogenic *Staphylococcus* species like *S. epidermidis*, *S. intermedius* and *S. pseudointermedius*. The internal control DNA can be added separately directly to the sample to monitor DNA extraction efficiency or later on to the PCR master mix to control the PCR setup individually. The internal control DNA is detected by a homologous primer/probe system.

Onar[®]MRSA contains the nucleotide dUTP instead of dTTP. The heat-labile Uracil-DNA Glycosylase (UNG) is suitable to prevent carry-over contamination between PCRs. This technique relies on the incorporation of deoxyuridine triphosphate (dUTP) during all amplified reactions and the pretreatment of all successive PCR mixtures with the heat-labile UNG. UNG is not provided with Onar[®]MRSA.

3. Test Protocol

3.1 Preparation of Sample Material

Clinical samples should be from all kinds of infection from the patients. Primarily swabs from skin infections, furuncles, ichors and blood as well as medical equipment such as catheter are suitable immediate testing. Swabs should be sterile and without medium (e.g. Darcin[®]). It is necessary to prepare templates for PCR analysis by DNA extraction using a suitable DNA extraction kit (e.g. MB DNA Extraction Kit, Cat. No. 56-1100). 10 µl of the DNA extract can be used directly as PCR template. The extracts can be stored at temperatures of below -18 °C for a period of one year. Repeated freezing and thawing or storage in the refrigerator for more than 12 hours should be avoided. The sample should not contain more than 100 µg/ml DNA. To avoid false positive results, we recommend the use of aerosol-preventive filter tips and gloves.

3.2 Rehydration of the Reagents

1. centrifuge tubes with lyophilized components (5 sec at maximum speed)
2. add 365 µl *Rehydration Buffer* to the *Primer/Probe/Nucleotide Mix*
4. add 300 µl of *PCR grade Water* to the *Internal Control DNA* and the *Positive Control DNA*
3. incubate for 5 minutes at room temperature
4. vortex and centrifuge again



Keep reagents on ice and store below -18 °C after rehydration.

3.3 Experimental Protocols and Result Reading

3.3.1 LightCycler®2.0

Program 1: Pre-incubation

Cycles	1
Analysis Mode	None

Temperature Targets [°C] Segment 1

Target Temperature [°C]	95
Incubation time [min]	2:00
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0.0
Step Delay [Cycles]	0
Acquisition Mode	None



LightCycler® 2.0:

Please check the correct settings for the „seek temperature“, this should be adjusted on at least 90°C.

Program 2: Amplification

Cycles	45
Analysis Mode	Quantification

Temperature Targets [°C] Segment 1 Segment 2 Segment 3 Segment 4

Target Temperature [°C]	95	55	60	72
Incubation time [s]	0	5	7	5
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0	20.0	20.0	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0	0	0	0
Step Size [°C]	0.0	0.0	0.0	0.0
Step Delay [Cycles]	0	0	0	0
Acquisition Mode	None	None	Single	None



Segment 3 is essential for the performance of the kit. Do not skip or modify this step.

Program 3: Cooling

Cycles	1
Analysis Mode	None

Temperature Targets [°C] Segment 1

Target Temperature [°C]	40
Incubation time [s]	30
Temperature Transition Rate [°C/s]	20.0
Secondary Target Temperature [°C]	0
Step Size [°C]	0.0
Step Delay [Cycles]	0
Acquisition Mode	None

The incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95 °C. Please see polymerase data sheet for duration

Result Reading:

- Select the fluorescence channel 1, 2, and 3.
- Click on *Quantification* to generate the amplification plots and the specific *ct*-values
- The threshold will be generated automatically.
- Samples showing no significant increase in the amplification plot can be considered as negative.

target	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Internal control
channel for LC 2.0	channel 1 (530)	channel 3 (610)	channel 2 (560)

3.3.2 *Rotorgene 6000 (5-plex)*

Program Step 1: Pre-incubation

Setting	Hold
Hold Temperature	95 °C
Hold Time	3 min 0 sec



Please check the correct settings for the filter combination:

green filter (470-510): MRSA (*mecA*) target

orange filter (585-610): *S. aureus* (*femA*)

yellow filter (530-555): internal control

Program Step 2: Amplification

Setting	Cycling
Cycles	45
Denaturation	95°C for 5 sec
Annealing	55°C for 10 sec —> acquiring to Cycling A (green, orange and yellow)
Elongation	72°C for 7 sec
Gain setting	automatic (auto Gain)
Slope Correct	activated
Ignore First	deactivated

Result Reading:

- Open the menu *Analysis*
- Select *Quantitation*
- Check the required filter set (green, yellow or orange) according to the following table and start data analysis by double click.
- The following windows will appear:
 - Quantitation Analysis - Cycling A* (green/orange or yellow)
 - Quant. Results - Cycling A* (green/orange or yellow)
 - Standard Curve - Cycling A* (green/orange or yellow)
- In window *Quantitation Analysis*, select first *linear scale* and then *slope correct*
- Threshold setup: (not applicable if a standard curve was carried with the samples and auto threshold was selected)
 - In window *CT Calculation* set the threshold value to 0-1
 - Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- The *ct*-values can be taken from the window *Quant. Results*.
- Samples showing no *ct*-value can be considered as negative.

target	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Internal control
channel	green	orange	yellow

3.3.3 ABI 7500

Detector Settings:

MRSA (*mecA*) Target Probe: Reporter - FAM Quencher - none
S. aureus (*femA*) Target Probe: Reporter - ROX Quencher - none
Internal Control Probe: Reporter - VIC Quencher - none



**The ROX Reference needs to be disabled. Activate both detectors for each well.
Measurement of fluorescence during extension.**

Program Step 1: Pre-incubation

Setting Hold
Temperature 95 °C
Incubation time 3:00 min



The incubation time depends on the polymerase used. Hot start enzymes need to be activated at 95 °C. Please see polymerase data sheet for duration.

Program Step 2: Amplification

Cycles 45
Setting Cycle
Denaturing 95 °C für 30 sek
Annealing 55 °C für 30 sek
Extension 60 °C für 45 sek

Result Reading:

- Enter the following basic setting at the right task bar:
Data: Delta RN vs. Cycle
Detector: FAM, ROX, VIC etc.
Line Color: Well Color

target	<i>mecA</i>	<i>femA</i>	Internal control
channel	FAM	ROX	VIC

- Open a new window with for the *Graph settings* by clicking the right mouse button
Select the following setting and confirm with *ok*:
Real Time Settings: Linear
Y-Axis Post Run Settings: Linear and Auto Scale
X-Axis Post Run Settings: Auto Scale
Display Options: 2
- Initiate the calculation of the ct-values and the graph generation by clicking on *Analyze* within the report window.
- Pull the threshold line into the graph. Adapt the threshold line to the initial linear section of the positive control reaction.
- Samples showing no ct-value can be considered as negative.

3.4 PCR Master Mix Setup

Total volume per reaction is 25 μ l. When setting up reactions, calculations should also include positive (PC) and negative controls (NC). Prepare the master mix in a 1.5 ml reaction tube and mix gently. Do not vortex!

	for 1 reaction	for 25 reactions-
Primer/Probe/Nucleotide Mix	14,0 μ l	350,0 μ l
Internal Control DNA	1,0 μ l	25,0 μ l
polymerase (5 U/ μ l)	0,2 μ l	5,0 μ l
	15,2 μ l	380,0 μ l



The total duration from master mix preparation to PCR cycling must not exceed 45 minutes to avoid a decrease in the fluorescent signal.

Aliquot 15 μ l of master mix into each PCR reaction tube. Pipett 10 μ l of sample elution buffer or DNA-free water per tube as negative control. Seal the tubes. Add 10 μ l of sample per PCR reaction tube. Seal these tubes as well before proceeding with the positive controls or standards. Add 10 μ l of the positive control to the remaining tubes as the last step in order to avoid cross contamination.

master mix	15,0 μ l
template DNA, NC or PC	10,0 μ l
total test volume	25,0 μ l

3.5 Result Interpretation

The presence of MRSA in the sample is indicated by an increasing fluorescence signal in the *mecA* channel during PCR. The concentration of the contaminant can be calculated by a software comparing the crossing cycle number of the sample with a standard curve created in the same run. An increase of the fluorescence signal in *femA* channel shows the presence of *S. aureus* and in combination with the amplification of the *mecA* specific gene fragment confirms the presence of MRSA in the sample.

A successfully performed PCR without inhibition is indicated by an increasing fluorescence signal in the internal control channel, provided the Internal Control was added to the master mix. MRSA DNA and Internal Control DNA are competitors in PCR. Because of the very low concentration of Internal Control in the PCR mix, the signal strength in this channel is reduced with increasing MRSA DNA loads in the sample.

<i>mecA</i> PCR	<i>femA</i> PCR	Internal Control	Interpretation
positive	positive	irrelevant	MRSA or MRCoNS* with MSSA
positive	negative	irrelevant	MRCoNS
negative	positive	irrelevant	MSSA
negative	negative	negative	PCR inhibition
negative	negative	positive	MRSA negative

*MRCoNS: methicillin resistant coagulase negative *Staphylococcus*

4. Trouble shooting

Before repeating a negative and a positive control run please check the cycler protocol and pipetting scheme. When using polymerases other than the MB TAQ DNA Polymerase, please note the comments made under chapter 1. The concentration can then be raised up to 2.5 U/reaction. Please note the complete change of the pipetting scheme.

Insufficient (inhibition) or no amplification of the internal control may be due to the following reasons:

- activity of *Taq* polymerase is insufficient or enzyme not compatible with the kit buffer
- programming mistake
- pipetting mistake
- sample elution buffer and sample used to complete the negative control are different

5. Product Specification

<i>Intended use</i>	Monitoring of methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA) DNA in clinical samples
<i>Regulatory status</i>	CE labelled according to IVD Directive 98/79/EC Annex II for the complete process from sample preparation to result
<i>Analytical sensitivity</i>	Detection of less than 10 MRSA particles per test (10 µl).
<i>Diagnostic specificity</i>	98.6 % (1022 swab samples, compared with Chromagar plates)
<i>Diagnostic sensitivity</i>	86.7 % (1022 swab samples , compared with Chromagar plates)
<i>Dynamic range</i>	50 to 5x10 ⁶ GU/reaction
<i>Subtype inclusivity</i>	All known SCCmec variants
<i>Exclusivity</i>	No cross reactivity with <i>S. epidermidis</i> , <i>S. intermedius</i> and <i>S. pseudointermedius</i> and commensally present organisms in the oral flora or known community acquired pathogens, like <i>Legionella pneumophila</i> or <i>Mycoplasma pneumoniae</i>
<i>Quantitative range</i>	Using MB DNA extraction kit: 150 to 5x10 ⁶ GU/reaction

Related Products

MB Taq DNA Polymerase

53-0050/-0100/-0200/-0250 MB Taq DNA Polymerase 50/100/200/250 units

Clinical Diagnostic Kits for qPCR

21-2025/-2100/-2250	Onar®Ls <i>Legionella species</i>	25/100/250 tests
21-3025/-3100/-3250	Onar®Lp <i>Legionella pneumophila</i>	25/100/250 tests
20-2025/-2100/-2250	Venor®Mp <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	25/100/250 tests
24-2025/-2100/-2250	Onar®Ct <i>Chlamydia trachomatis</i>	25/100/250 tests
23-2025/-2100	Onar®Syphilis <i>Treponema pallidum</i>	25/100 tests
25-2025/-2100/-2250	Onar®Pertussis <i>Bordetella pertussis/parapertussis</i>	25/100/250 tests

Quantification Standards, 100 µl each, 1x10⁸ genomes/µl

52-0101	<i>Legionella pneumophila</i> DNA Standard
52-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> DNA Standard

Genomic DNA Extracts, 100 µl each, +/- 10 ng / 100 µl

51-0566	<i>Streptococcus pneumoniae</i> , DSMZ 20566
51-5571	<i>Bordetella pertussis</i> , DSMZ 5571
51-3415	<i>Bordetella parapertussis</i> , DSMZ 13415
51-0177	<i>Ureaplasma urealyticum</i> , NC 10177
51-0111	<i>Mycoplasma hominis</i> , NC 010111
51-0112	<i>Mycoplasma orale</i> , NC 010112
51-0117	<i>Mycoplasma fermentans</i> PG19, NC 010117
51-0119	<i>Mycoplasma pneumoniae</i> , NC 010119
51-0129	<i>Mycoplasma arginini</i> , NC 010129
51-0162	<i>Mycoplasma arthritidis</i> , NC 010162
51-0195	<i>Mycoplasma genitalium</i> , NC 010195
51-1746	<i>Mycoplasma penetrans</i> , NC 11746

DNA Remove™

15-2025	DNA Decontamination Reagent, spray bottle	250 ml
15-2200	DNA Decontamination Reagent, refill bottles	4 x 500 ml