

**CONGEN**

# SureFast<sup>®</sup> MRSA 4plex

Art. No. F7117  
100 rxn

## User Manual



**June 2020**

 **Inhalt**

1	Allgemeines .....	3
1.1	Beschreibung .....	3
1.2	Nachweisgrenze .....	3
1.3	DNA-Präparation .....	4
1.4	Kit-Inhalt und Lagerung .....	4
1.5	Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien .....	4
1.6	Geräteeinstellungen .....	4
1.7	Detektionskanaleinstellungen .....	5
2	Qualitative Analyse .....	6
2.1	Protokoll .....	6
2.1.1	Herstellen des Master-Mix .....	6
2.1.2	Herstellen des real-time PCR-Mix .....	7
2.2	Interpretation der Ergebnisse .....	7
3	Weitere Informationen .....	8
3.1	Weitere Dokumente und Hilfsmittel .....	8
3.2	Technischer Support .....	8

 **Content**

1	General Information .....	9
1.1	Description .....	9
1.2	Limit of Detection .....	9
1.3	DNA-preparation .....	10
1.4	Kit components and storage .....	10
1.5	Additionally required equipment and materials .....	10
1.6	Setup .....	10
1.7	Detection channel Set-up .....	11
2	Qualitative Analysis .....	12
2.1	Protocol .....	12
2.1.1	Preparation of the master-mix .....	12
2.1.2	Preparation of the real-time PCR-mix .....	13
2.2	Interpretation of results .....	13
3	Further Information .....	14
3.1	Product Information .....	14
3.2	Technical Support .....	14

## **1 Allgemeines**

### **1.1 Beschreibung**

SureFast® MRSA 4plex ist eine real-time PCR zum direkten qualitativen Nachweis und zur Differenzierung spezifischer DNA-Sequenzen der Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA). Es wird die SCC*mecI*/*orfX* junction, die resistenzspezifische Sequenz *mecA/mecC* und eine *Staphylococcus aureus* spezifische DNA-Sequenz nachgewiesen.

Der Test ist mit einer Internal Control DNA (ICD) ausgestattet, die gleichzeitig als interne Amplifikationskontrolle und Extraktionskontrolle verwendet werden kann. Bei Anwesenheit von inhibitorischen Substanzen in der DNA wird das Signal der Amplifikationskontrolle gestört oder die Amplifikation unterdrückt. Einige Beispiele für PCR-inhibitorische Substanzen sind Alkohole (z.B. Ethanol, Isopropanol), Tenside (z.B. CTAB, SDS, Triton X100) und Salze (z.B. Natriumchlorid). Des Weiteren können Gewürze, Kräuter, Algen, Kakao und andere Probenmatrizes inhibierend wirken.

Das Nachweisverfahren kann mit allen gängigen real-time PCR Geräten, die mindestens vier Reporterfarbstoffe gleichzeitig in den Kanälen FAM, VIC/HEX, ROX und Cy5 detektieren können, verwendet werden. Die technische Gerätevalidierung erfolgte am Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 und Agilent Mx3005P.

### **1.2 Nachweisgrenze**

Die SureFast® MRSA 4plex real-time PCR hat eine Nachweisgrenze von  $\leq 5$  DNA-Kopien.

Die Nachweisgrenze des Gesamtverfahrens ist abhängig von Probenmatrix, Prozessierungsgrad, DNA-Präparation und DNA-Gehalt.

Die SureFast® PCR Systeme sind sehr sensitiv. Demzufolge sind bereits sehr geringe Ziel-DNA Gehalte für eine Analyse ausreichend. Über die Bestimmung der Gesamt-DNA in der Probe werden keine Informationen über die Menge und die Qualität an Ziel-DNA erhalten.

### 1.3 DNA-Präparation

Dieser Test enthält eine Internal Control ICD (ICD), die entweder nur als interne Amplifikationskontrolle oder als positive Extraktionskontrolle für die Probenpräparation mit gleichzeitiger Inhibitionskontrolle verwendet werden kann.

Wird die ICD nur als interne Amplifikationskontrolle verwendet, muss 1 µl pro Reaktion der ICD dem Master-Mix hinzugefügt werden (siehe Punkt 2.1.1).

Wird die ICD als Extraktionskontrolle für die Probenpräparation mit gleichzeitiger Inhibitionskontrolle verwendet, müssen 20 µl der ICD während der Extraktion eingesetzt werden. Die ICD wird vor der Lyse zu der schon mit Lysis Buffer versetzten Probe gegeben und sollte nicht direkt auf das Probenmaterial pipettiert werden.

#### Für Tupfer:

In ein Reaktionsgefäß 200 µl Lysis Buffer 1 geben. Den Tupfer in den vorgelegten Lysis Buffer 1 eintauchen und den Stab abbrechen oder abschneiden. Das Reaktionsgefäß dicht verschließen und 60 Sekunden stark vortexen. Danach im Heizblock für 10 Minuten bei 95°C unter Schütteln erhitzen. Anschließend bei 12.000 rpm 1 min zentrifugieren und den Überstand als Probe einsetzen.

#### Für Abschwemmungen und Anreicherungen:

Für die DNA-Präparation wird der SureFast® PREP Bacteria (Art. Nr. F1021) empfohlen. Um das Wachstumspotenzial des Bakteriums besser beurteilen zu können, wird angeraten, die Proben zu Beginn und am Ende der kulturellen Voranreicherung zu analysieren (Wachstum ab einer Cp-Wert Differenz von > 3).

### 1.4 Kit-Inhalt und Lagerung

Kit Code	Reagenz	Menge	Deckelfarbe
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Gelb
2	Taq Polymerase	1 x 15 µl	Rot
D	Internal Control DNA	2 x 1800 µl	Orange
N	PCR Water	1 x 500 µl	Weiß
P	Positive Control	1 x 250 µl	Hellblau
L	Lysis Buffer 1	2 x 12 mL	Klar

**Die Reagenzien sind lichtgeschützt bei –20°C zu lagern.**

### 1.5 Zusätzliche benötigte Geräte und Materialien

- DNA-Extraktionskit (z.B. SureFast® PREP Bacteria Art. Nr. F1021)
- Real-time PCR Gerät mit vier Detektionskanälen (510 nm, 580 nm, 610 nm und 660 nm)
- Real-time PCR Verbrauchsmaterialien (Platten, Gefäße, Folien, Deckel)
- Pipetten, Pipettenspitzen mit Filtern
- Einmalhandschuhe, puderfrei
- Vortexmischer
- Mikrozentrifuge mit Rotor für Reaktionsgefäße

### 1.6 Geräteeinstellungen

	<b>Blockcycler &amp; R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcycler &amp; LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD) Cycles	1 min, 95°C 45	1 min, 95°C 45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.7 Detektionskanaleinstellungen**

<b>Real-time PCR Gerät</b>	<b>Nachweis</b>	<b>Detektionskanal</b>	<b>Quencher</b>	<b>Bemerkung</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	+	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	+	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	None	Stellen Sie den passiven Referenzfarbstoff ROX auf none.
	IAC	VIC	None	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	None	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	None	
<b>Bio-Rad CFX96Dx</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	+	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	533-580	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	533-610	+	
	<i>mecA/mecC</i>	618-660	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	465-510	+	Das SureCC Color Compensation Kit I (Art. Nr. F4009) wird benötigt.
	IAC	540-580	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	540-610	+	
	<i>mecA/mecC</i>	610-670	+	

## 2 Qualitative Analyse

### 2.1 Protokoll

#### 2.1.1 Herstellen des Master-Mix

Die Gesamtzahl der für die PCR benötigten Reaktionen (Proben und Kontrollreaktionen) ist zu berechnen. Folgende Kontrollen werden empfohlen: Negativkontrolle, Extraktionskontrolle und Positivkontrolle. Bei Analysen von Anreicherungen werden zusätzlich weitere Kontrollen empfohlen: Nullkontrolle (Probe vor der Anreicherung) und Mediumkontrolle. Dieser Test enthält eine interne Amplifikationskontrolle (ICD), die als positive Extraktions- bzw. Inhibitionskontrolle eingesetzt werden kann.

#### **Benötigte Reaktionen für den qualitativen *SCCmec/orfX junction* , *Staphylococcus aureus* und *mecA/mecC* - Nachweis:**

3 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

#### **Benötigte Reaktionen für den qualitativen *SCCmec/orfX junction* , *Staphylococcus aureus* und *mecA/mecC*-Nachweis in Anreicherungen:**

5 Reaktionen für Kontrollen (1x Negativkontrolle, 1x Extraktionskontrolle, 1x Positivkontrolle, 1x Nullkontrolle, 1x Mediumkontrolle)

Je Probe: mindestens 1 Reaktion für jede Proben-DNA

Des Weiteren wird empfohlen den Mix mit 10 % zusätzlichem Volumen anzusetzen, um einen Pipettierverlust auszugleichen. Vor der Benutzung die Reagenzien auftauen, mischen und zentrifugieren.

#### **Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICD als Extraktions- und Inhibitionskontrolle:**

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
Taq Polymerase	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**Master-Mix mischen und anschließend kurz zentrifugieren.**

#### **Beispiel für die Berechnung und Herstellung von 10 Reaktionen bei Verwendung der ICR als interne Inhibitionskontrolle:**

Komponenten des Master-Mix	Menge pro Reaktion	10 Reaktionen (zusätzlich 10%)
Reaction Mix	19,9 µl	218,9 µl
ICR	1,0 µl	11 µl
Enzyme Mix	0,1 µl	1,1 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>21,0 µl</b>	<b>231,0 µl</b>

## 2.1.2 Herstellen des real-time PCR-Mix

- Pipettieren von 20 µl des Master-Mix in das jeweilige Reaktionsgefäß.
- Verschließen der Negativkontrolle (Die Negativkontrolle besteht nur aus dem Master-Mix).
- Pipettieren von 5 µl der Proben-DNA in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Pipettieren von 5 µl Positive Control in die vorgesehenen Reaktionsgefäße. Verschließen der Gefäße.
- Kurzes Zentrifugieren der Reaktionsgefäße mit wenigen Umdrehungen pro Minute.
- Reaktionsgefäße in das real-time PCR Gerät einsetzen und entsprechend der Geräteeinstellungen starten.

## 2.2 Interpretation der Ergebnisse

Die Auswertung der Ergebnisse wird mit der Analyse Software der jeweiligen real-time PCR Geräte nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

Die Kontrollreaktionen müssen die korrekten Ergebnisse zeigen.

Im FAM-Kanal wird der Parameter *SCCmec/orfX junction*, im ROX-Kanal der Parameter *Staphylococcus aureus* und im Cy5-Kanal der Parameter *mecA/mecC* detektiert (Siehe Tabelle). Im VIC/HEX-Kanal wird eine interne Amplifikationskontrolle (IAC) detektiert.

Eine Probe wird **positiv** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA eine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt. Hohe Konzentrationen des Amplikons können zu einem schwachen oder fehlenden Signal der internen Amplifikationskontrolle (IAC) führen.

Ein Cp-Wert für die IAC ist nicht erforderlich um ein positives Ergebnis der Positivkontrolle zu erhalten.

Eine Probe wird als **negativ** für den jeweiligen Parameter bewertet, wenn die Proben-DNA keine Amplifikation im jeweiligen Kanal zeigt und die zugehörige interne Kontrolle (VIC/HEX-Kanal) **positiv** mit einer Cp-Abweichung  $\leq 2$  zur Negativkontrolle ist. Sollte die Proben-DNA im VIC/HEX-Kanal **keine Amplifikation** oder eine Cp-Abweichung  $> 2$  zur Negativkontrolle zeigen, sind in der Proben-DNA Inhibitoren enthalten, die die PCR unterdrücken. Ein starker Abfall des Fluoreszenzsignals kann ebenfalls eine Inhibition anzeigen. In diesen Fällen muss die Isolierung und Reinigung der DNA aus der entsprechenden Probe verbessert werden. Alternativ kann die DNA verdünnt (Empfehlung 1:2 in PCR-Wasser) und wiederholt auf Inhibition getestet werden. Beachten Sie bitte, dass sich die Nachweisgrenze für die Probe im spezifischen Nachweissystem für *SCCmec/orfX junction*, *Staphylococcus aureus* oder *mecA/mecC* mit dem gewählten Verdünnungsfaktor ändert.



Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal <i>SCCmec/orfX junction</i>	ROX-Kanal <i>Staphylococcus aureus</i>	Cy5-Kanal <i>mecA/mecC</i>	VIC/HEX-Kanal IAC	
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	MRSA*
negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	Mischinfektion MSSA** und CoNS*** (Methicillin/Oxacillin-Resistenz)
<b>positiv</b>	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/negativ</b>	MSSA**
negativ	<b>positiv</b>	negativ	<b>positiv/negativ</b>	MSSA**
negativ	negativ	<b>positiv</b>	<b>positiv/negativ</b>	CoNS*** (Methicillin/Oxacillin-Resistenz)
negativ	negativ	negativ	<b>positiv</b>	negativ
negativ	negativ	negativ	negativ	nicht auswertbar

\* MRSA = Methicilin-resistenter *S.aureus*

\*\* MSSA = Methicilin sensibler *S.aureus*

\*\*\* CoNS = Koagulase-negative Staphylokokken

## 3 Weitere Informationen

### 3.1 Weitere Dokumente und Hilfsmittel

- Detaillierte Informationen zur Einstellung bestimmter real-time PCR Geräte  
(Download: [www.congen.de/unternehmen/download](http://www.congen.de/unternehmen/download))
- Validierungsdaten auf Anfrage

### 3.2 Technischer Support

Bei Fragen zur Durchführung wenden sie sich bitte per E-Mail an [info@congen.de](mailto:info@congen.de).

## **1 General Information**

### **1.1 Description**

The SureFast® MRSA 4plex is a real-time PCR for the direct, qualitative detection and differentiation of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). The test detects the *SCCmecIorfX* junction, the *mecA/mecC*-gene and a specific DNA sequence of *Staphylococcus aureus*.

The test assay contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control for the sample preparation procedure and as a PCR inhibition control.

If the DNA contains PCR inhibiting substances, the signal of the amplification control will be affected or the amplification will be suppressed. Examples for PCR inhibiting substances are alcohols (e.g. ethanol, isopropanol), surfactants (e.g. CTAB, SDS, Triton X100) and salts (e.g. sodium chloride). In addition spices, herbs, algae, cocoa and further sample matrices might have PCR inhibiting effects.

The real-time PCR assay can be performed with commonly used real-time PCR instruments, equipped for detection of four fluorescence emissions at the channels FAM, VIC/HEX, ROX and Cy5 at the same time. The technical validation of instruments was performed on Roche LightCycler® 480 II, Roche cobas® z 480 Analyzer, Applied Biosystems 7500, Bio-Rad CFX96 and Agilent Mx3005P.

### **1.2 Limit of Detection**

The SureFast® MRSA 4plex real-time PCR has a limit of detection of  $\leq 5$  DNA copies.

The assay limit of detection depends on sample matrix, processing grade, DNA preparation and DNA content.

The SureFast® PCR systems are very sensitive and therefore even a small amount of target DNA is sufficient for a successful analysis. The concentration of total DNA in the sample does not allow a conclusion on the quantity and quality of the target DNA.

**1.3 DNA-preparation**

The test assay contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control for the sample preparation procedure and as a PCR inhibition control.

If the ICD is used only as a PCR inhibition control, 1 µl per reaction of the ICD should be added to the master-mix (see point 2.1.1).

If the ICD is used as an extraction control for the sample preparation procedure and as PCR inhibition control, 20 µl of the ICD should be added during extraction procedure. The ICD should always be pipetted to the sample with added Lysis Buffer and must not be added directly to the raw sample.

For swabs

Add 200 µl Lysis Buffer 1 into a preparation tube. Insert the swab in the pre-pipetted Lysis Buffer 1 and cut or break the swab stem. Cap the preparation tube tightly and vortex strongly for 60 seconds. Heat and shake the preparation tube at 95 °C for 10 minutes in a heating block. Centrifuge for 1 minute at 12,000 rpm and apply the supernatant as sample.

For avulsions and enrichments

Therefore, the use of SureFast® PREP Bacteria is recommended. To assess the process of bacterial growth, it is recommended to compare the samples at the beginning and at the end of the culturing (bacterial growth at Cp difference > 3).

**1.4 Kit components and storage**

Kit Code	Reagent	Amount	Lid Color
1	Reaction Mix	2 x 1100 µl	Yellow
2	Taq Polymerase	1 x 15 µl	Red
D	Internal Control DNA	2 x 1800 µl	Orange
N	PCR Water	1 x 500 µl	White
P	Positive Control	1 x 250 µl	Light Blue
L	Lysis Buffer 1	2 x 12 mL	Clear

**Store all reagents at –20°C and protected from light.**

**1.5 Additionally required equipment and materials**

- DNA-Extraction kit (e.g. SureFast® PREP Bacteria Art. No. F1021)
- real-time PCR instrument with four detection channels (510 nm, 580 nm, 610 nm and 660 nm)
- real-time PCR consumable (plates, tubes, capillaries, foils, caps)
- pipettes with filter tips
- powder-free disposable gloves
- Vortex mixer
- microcentrifuge with a rotor for the reaction tubes

**1.6 Setup**

	<b>Blockcytcler &amp; R-Biopharm RIDA®CYCLER</b>	<b>Rotorcytcler &amp; LightCycler® 480 II</b>
Initial Denaturation (HOLD)	1 min, 95°C	1 min, 95°C
Cycles	45	45
Denaturation	15 sec, 95°C	10 sec, 95°C
Annealing/Extension (CYCLE)	30 sec, 60°C	15 sec, 60°C
Temperature Transition Rate/ Ramp Rate	Maximum	Maximum

**1.7 Detection channel Set-up**

<b>Real-time PCR device</b>	<b>Detection</b>	<b>Detection channel</b>	<b>Quencher</b>	<b>Note</b>
<b>Agilent Mx3005P</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	+	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	+	
<b>Agilent AriaDx</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	+	
	IAC	HEX	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	+	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	+	
<b>Applied Biosystems 7500</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	None	Check the passive reference option ROX is none.
	IAC	VIC	None	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	None	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	None	
<b>Bio-Rad CFX96</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	FAM	+	
	IAC	VIC/HEX	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	ROX	+	
	<i>mecA/mecC</i>	Cy5	+	
<b>Roche LightCycler® 480 II</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	533-580	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	533-610	+	
	<i>mecA/mecC</i>	618-660	+	
<b>Roche cobas® z 480 Analyzer</b>	<i>SCCmec/orfX junction</i>	465-510	+	The SureCC Color Compensation Kit I (Art. No. F4009) is required.
	IAC	540-580	+	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	540-610	+	
	<i>mecA/mecC</i>	610-670	+	

## 2 Qualitative Analysis

### 2.1 Protocol

#### 2.1.1 Preparation of the master-mix

Calculate the total number of reactions needed (samples and control reactions) for the specific PCR assay as well as for the inhibition control.

Recommended control reactions for the specific PCR assay: negative control, extraction control, positive control. For the analysis of enrichments additional controls are recommended: zero control (sample before enrichment) and medium control. The test assay contains an Internal Control DNA (ICD), which can either be used as PCR inhibition control or as positive extraction control.

#### **Reactions needed for the qualitative *SCCmec/orfX* junction, *Staphylococcus aureus* and *mecA/mecC* - detection:**

3 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1x positive control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

#### **Reactions needed for the qualitative *SCCmec/orfX* junction, *Staphylococcus aureus* and *mecA/mecC* - detection in enrichments:**

5 reactions for controls (1x no-template control, 1x extraction control, 1x positive control, 1x zero control, 1x medium control)

For each sample: at least 1 reaction for each sample DNA

It is also recommended to prepare the master-mix with 10 % additional volume in order to compensate reagent loss. Allow the reagents to thaw, mix and centrifuge before opening and use.

#### **Example for the calculation and preparation of 10 reactions:**

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
Taq Polymerase	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>20 µl</b>	<b>220 µl</b>

**Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.**

#### **Example for the calculation and preparation of 10 reactions for ICR only as PCR inhibition control:**

Components of the master-mix	Amount per reaction	10 reactions (with 10% excess)
Reaction Mix	19.9 µl	218.9 µl
ICR	1 µl	11.0 µl
Enzyme Mix	0.1 µl	1.1 µl
<b>Total volume</b>	<b>21.0 µl</b>	<b>231.0 µl</b>

**Mix each master-mix well and centrifuge shortly before use.**

### **2.1.2 Preparation of the real-time PCR-mix**

- Pipette 20 µl of the master-mix into appropriate tubes/wells.
- Close the negative control (the negative control is ready for PCR without any addition).
- Pipette 5 µl of sample DNA into the designated tubes/wells and close them.
- Pipette 5 µl of Positive Control into the designated tubes/wells and close them.
- Centrifuge all tubes/plates or capillaries shortly at low speed.
- Place tubes/plates into the real-time PCR instrument and start the run according to the setup.

### **2.2 Interpretation of results**

The evaluation has to be made according to the usual analysis program recommended by the real-time PCR instrument manufacturer.

The control reactions have to show the correct results.

*SCCmec/orfX* junction is detected in the FAM-channel, *Staphylococcus aureus* DNA is detected in the ROX-channel and *mecA/mecC* gene is detected in the Cy5-channel (see table). In the VIC/HEX-channel the amplification control is detected.

A sample is stated **positive** for the respective parameter, if the sample DNA shows amplification in the respective channel. High amplicon concentrations can result in a weak or absent signal of the internal amplification control (IAC).

A Cp value for the internal amplification control (IAC) is not needed to obtain a positive result of the positive control.

A sample is stated **negative** for the respective parameter, if the sample DNA shows no amplification in the respective channel and if the internal control (VIC/HEX-channel) of the sample is **positive** with a shift in Cp-value  $\leq 2$  compared to the negative control. If the sample DNA in the VIC/HEX-Channel shows **no amplification** or a shift in Cp-value  $> 2$  compared to the negative control, it contains PCR inhibiting substances. A significant decrease in the fluorescence signal can also show the presence of PCR inhibiting substances. Under these circumstances DNA isolation and purification of the sample need to be improved. Alternatively the DNA can be diluted (recommendation 1:2 in PCR-water) and analysed again for inhibition. Please note that the dilution factor also affects the detection limit of the specific *SCCmec/orfX*, *Staphylococcus aureus* or *mecA/mecC* PCR assay.

Ergebnis im jeweiligen Kanal				Interpretation
FAM-Kanal <i>SCCmec/orfX junction</i>	ROX-Kanal <i>Staphylococcus aureus</i>	Cy5-Kanal <i>mecA/mecC</i>	VIC/HEX-Kanal IAC	
<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	MRSA*
negative	<b>positive</b>	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	mixed infection MSSA** und CoNS*** (Methicillin/Oxacillin-Resistance)
<b>positive</b>	<b>positive</b>	negative	<b>positive/negative</b>	MSSA**
negative	<b>positive</b>	negative	<b>positive/negative</b>	MSSA**
negative	negative	<b>positive</b>	<b>positive/negative</b>	CoNS*** (Methicillin/Oxacillin-Resistance)
negative	negative	negative	<b>positive</b>	negative
negative	negative	negative	negative	not evaluable

\* MRSA = Methicilin-resistant *S.aureus*

\*\* MSSA = Methicilin sensitive *S.aureus*

\*\*\* CoNS = Coagulase-negative Staphylococcus

### 3 Further Information

#### 3.1 Product Information

- Detailed information about setup of several real-time PCR devices  
(Download: [www.congen.de/en/company/downloads](http://www.congen.de/en/company/downloads))
- Validation Report upon request

#### 3.2 Technical Support

For further questions please send an e-mail to [info@congen.de](mailto:info@congen.de).