GEFÖRDERT VOM

Leibniz IPHT LEIBNIZ-INSTITUT für PHOTONISCHE TECHNOLOGIEN

Bundesministerium für Bildung und Forschung

Sachbericht Teil II: Eingehende Darstellung

Leibniz-Institut für photonische Technologien - Verbundvorhaben immunologische Labor- und Point-of-Care-Tests zum Nachweis von MRSA (ResiCheck);

Teilvorhaben: Genotypische Charakterisierung und Aufbereitung von MRSA Proben für Resistenz-Assays

Förderkennzeichen: 13GW0422C

Förderzeitraum: 01.12.2020 bis 30.11.2023

Zuwendungsempfänger:	Dr. med. habil. Stefan Monecke **Leibniz-IPHT** Optisch-Molekulare Diagnostik und Systemtechnologie Albert-Einstein-Straße 9, 07743 Jena
Förderkennzeichen:	13GW0422C
Vorhabensbezeichnung:	**immunologische Labor- und Point-of-Care-Tests zum Nachweis von MRSA (Akronym: ResiCheck)**
Verbundpartner:	Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie GmbH GA Generic Assays GmbH
Laufzeit des Vorhabens:	01.12.2020 bis 30.11.2023
Berichtszeitraum:	01.12.2020 bis 30.11.2023

Das diesem Bericht zugrunde liegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13GW0422C gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor.

1. Projektübersicht

Ziel des geplanten Forschungs- und Entwicklungsprojektes war es, immunologische

Nachweissysteme für die Genprodukte der Resistenzgene *mecA* und *mecC*, die beta-LaktamResistenz in *S. aureus*/MRSA verursachen, zu entwickeln. Der Nachweis der Genprodukte, also der exprimierten Proteine, erlaubt, im Gegensatz zum Nachweis des Gens, den tatsächlichen Nachweis der Antibiotikaresistenz als deren Funktion.

Die Ziele des hier beschriebenen Teilvorhabens waren die bioinformatische Detailanalyse der verfügbaren *mecA/mecC* Sequenzen inklusive der Selektion möglicher Peptidtargets und der Analyse möglicher Reaktivitäten und Kreuzreaktivitäten bei Projektstart, der gezielte Aufbau einer Sammlung relevanter phäno- und genotypisch charakterisierter Stämme zu Erprobungs- und Validierungszwecken, die Erforschung schonender Lyseverfahren, die einen Aufschluss der Bakterienzellen von *S. aureus* ohne Zerstörung anderer relevanter Proteinmarker ermöglicht und die möglichst routinenahe Erprobung von Demonstratoren.

Jahr		Projektjahr 1											Projektjahr 2											Projektjahr 3										
Projektmonat		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
Technishe Teilziele																			★																	
AS1-1	Beschaffung von Stämmen und deren Charakterisierung																																			
AS1-2	Aufbau und Charakterisierung einer Stammdatenbank																																			
AS1-3	Bioinformatik; Identifizierung von antigenen Strukturen					★																														
AS1-4	Bioinformatik; Identifizierung von Peptidsequenzen								★																											
AS1-5	Entwicklung eines schonenden Lyseprotokolls.																		★																	
AS1-6	Validierung der Testsysteme																																			
AS1-7	Feedback medizinscher Anwender																																	★		
Meilensteine mit ★ gekennzeichnet																																				
Technische Teilziele mit ★ gekennzeichnet																																				
Übergabe Punkte zu anderen Partnern ★																																				
Übergabe Punkte von anderen Partnern ★																																				

Abbildung 1: Zeitlicher Ablauf des Teilvorhabens am Leibniz-IPHT.

1.1. Detaillierte Darstellung des Teilprojektes

AS-1, AP-1 und -2: Beschaffung von Stämmen und deren Charakterisierung, Aufbau und Charakterisierung einer Stammsammlung und Datenbank

Im Rahmen der Projektarbeit wurde eine außerordentlich umfangreiche Stammsammlung kryokonservierter Bakterienkulturen [n=1349] angelegt und umfangreich charakterisiert, wobei auch Stämme ausländischer Partner (Kuweit, Ägypten, Trinidad & Tobago) und aus veterinärmedizinischen Quellen (FLI Jena, Veterinärmedizinische Universität Wien, FU Berlin) eingeschlossen wurden. Das beinhaltete 999 *S. aureus* (davon 377 MRSA; siehe Abb. 2), 3 *S. argenteus*, 2 *S. roterodami* und 2 *S. schweizeri*, sowie 61 Isolate der *Staphylococcus pseudintermedius/intermedius/delphini*-Gruppe. Die übrigen Isolate gehörten zu verschiedenen Spezies koagulasenegativer Staphylokokken, am häufigsten *S. epidermidis.*

Alle Isolate wurden auf Blutagar angezüchtet, konventionell (Katalase, Koagulase) identifiziert und teilweise auch phänotypisch charakterisiert (VITEK-2, BioMerieux). Dann wurde durch verschiedene Verfahren nicht fragmentierte und RNA-freie DNA aus den jeweiligen Isolaten präpariert und eine speziell von uns entwickelte Multiplex- Primerelongationsreaktion durchgeführt. Diese ist eine PCR-artige Reaktion, bei der aber nur ein Primer pro Targetgen eingesetzt wird, bei der aber dafür mehrere 100 Targets gleichzeitig markiert, vervielfältigt und nachgewiesen werden können. Die resultierenden Reaktionsprodukte wurden durch den Einbau von 16-Biotin-dUTP während des linearen Vervielfältigungsprozesses intern markiert und die Reaktionsprodukte dann mit einem spezifischen DNA-Mikroarray hybridisiert, nachdem dieser vorab mit PCR-Wasser und einem speziell optimierten Hybridisierungspuffer vorgewaschen wurde. Nach der stringenten Hybridisierung folgten Waschschritte und die Konjugation mit Streptavidin-Meerrettichperoxidase. Nach weiteren Waschschritten wurde ein spezieller Farbstoff

zugesetzt, der unter Peroxidase-Einfluss nach einer Redoxreaktion präzipitiert und damit ermöglichte, die Hybridisierung sichtbar zu machen, da die lokalisierte Ausfällung des Farbstoffs zur Bildung sichtbarer „Punkte“ auf der Oberfläche des DNA-Arrays bei der Durchlichtanalyse führt, die mit Hilfe eines Koordinatengitters und speziell entwickelter Software ausgewertet werden können. Die Arrays wurden so gescannt und ausgewertet, die Daten in einer extra dafür eingerichteten Oracle basierten Datenbank gespeichert. Das Vorhandensein von Präzipitation bedeutet ein positives Ergebnis, ihre Abwesenheit ein negatives Resultat. Daraus kann auf die An- oder Abwesenheit individueller Gene geschlossen werden und der (automatisierte) Vergleich von Hybridisierungsmustern mit Referenzprofilen erlaubt die Zuordnung zu Klonalen Komplexen und Epidemiestämmen. Durch diese Methode konnten alle Isolate auf je etwa 330 Gene/Allele untersucht werden, was auch die mit *mecA/C* assoziierten Gene der SCC*mec* Elemente beinhaltet. Dies entspricht bei 1349 Stämmen x 330 genetischen Targets = 445.170 einzelnen PCR Reaktionen, deren Information hier sehr deutlich schneller und ökonomischer gewonnen werden konnte.

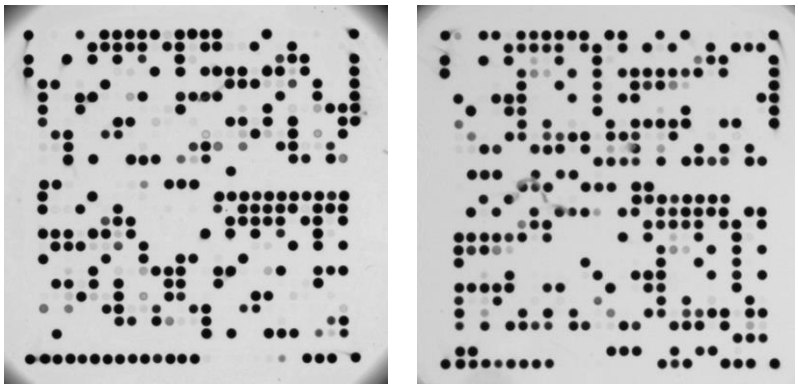


Abbildung 1: Hybridisierte Arrays mit „genetischen Fingerabdrücken“ von MRSA-Isolaten verschiedener Stämme (CC22-MRSAIV, CC80-MRSA-IV (PVL+))

Wenn bei der routinemäßigen Charakterisierung dieser Stämme mittels DNA-Array interessante, auffallende oder problematische Befunde beobachtet wurden, wurden ihre Genome (Oxford nanopore Verfahren) sequenziert. Insgesamt wurden Genomsequenzen von etwa 200 *S. aureus* und ca. 5 Isolaten der *Staphylococcus pseudintermedius/intermedius/delphini*-Gruppe erhoben und untersucht. Dies führte zu sechs bereits erschienenen Veröffentlichungen [1-6], sowie einer weiteren, die sich gegenwärtig im peer-review-Prozess befindet. Die Studien zeigen unter anderem, dass keine Probleme durch abweichende *mec*-Gensequenzen für den neuen Test zu erwarten und daß *mecC* nach wie vor selten ist.

Das Auftreten der *mecA/C* Gene sowie des klinisch interessanten Toxins Panton-ValentineLeukozidin (PVL) in den *S. aureus* Isolaten sind in Abbildung 2 gezeigt. Was die anderen Spezies betrifft: in *S. argenteus, S. roterodami* und *S. schweitzeri* wurden weder *mecA* noch PVL Gene gefunden, wenn auch beide gelegentlich in *S. argenteus* auftreten können (und von uns außerhalb dieses Projektes auch gefunden wurden). Das *mecA*-Gen ist häufig in koagulasenegativen Staphylokokken und Isolaten der *Staphylococcus pseudintermedius/intermedius/delphini*-Gruppe nachzuweisen. Daher wurden auch gezielt solche Stämme gesammelt, asserviert und stichprobenweise getestet. Sie können im Rahmen einer zukünftigen Produktentwicklung und Zulassung nach CE-IVD dem Industriepartner auf Anfrage zur Verfügung gestellt werden, auch mit Hinblick auf das Vorhandensein weiterer *mec*Genvarianten.

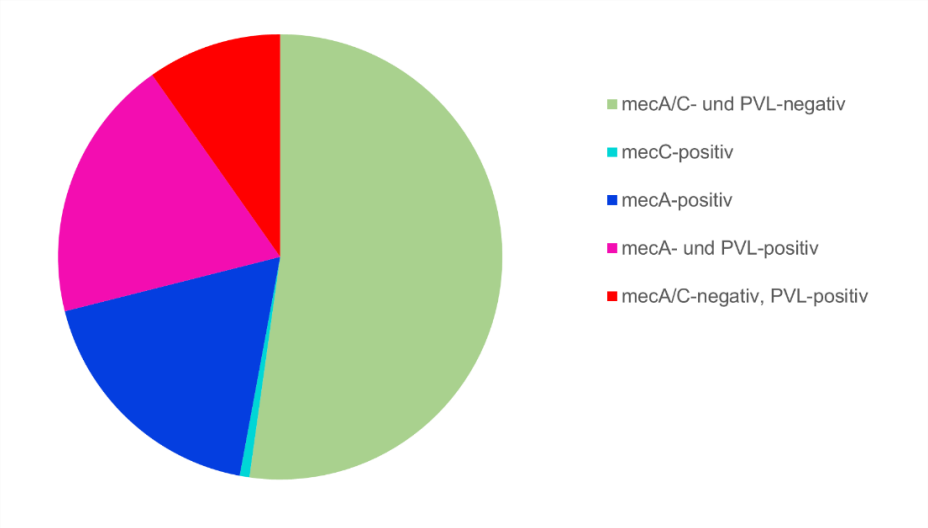


Abbildung 3: Auftreten von *mec*-Genen und PVL in den *S. aureus*-Isolaten der ResiCheck Stammsammlung.

Es gibt zunehmend häufig und besonders in Ägypten, im Nahen und Mittleren Osten „neue“ Epidemiestämme, welche die Gene für das Toxin Panton-Valentine-Leukozidin, PVL, und für Fusidinsäureresistenz tragen und die auch bei uns zu erwarten sind, während klassische „Hospital-acquired“ (Krankenhaus-) MRSA-Stämme eher selten sind, und immer seltener werden. Dies zeigt exemplarisch eine Studie, die wir in Kooperation mit einem Krankenhaus der Maximalversorgung in Alexandria, Ägypten durchführen und publizieren konnten [1]. Hier zeigen sich extrem hohe Raten an PVL (40%, bei uns liegt diese Rate in MRSA um 5-10%) und *fusC* (83%, bei uns liegt diese Rate in MRSA um 1-5% mit aktuell steigender Tendenz). Da durch Tourismus und Migration damit zu rechnen ist, dass diese und ähnliche Stämme auch bei uns zu erwarten sind, ist diese Information ein wichtiger Hinweis für die Industriepartner mit Hinblick auf die Priorisierung weiterer Targets für künftige Testentwicklungen und die Weiterentwicklung und Zulassung des gemeinsam erforschten Tests.

Klonaler Komplex	Stamm	n	%
CC1	CC1-MRSA-[V+*fus*+*tir*+ccrA/B-1]	3	10.0
	CC1-MRSA-[V+*fus*+*tir*+ccrA/B-1] (PVL+)	5	16.7
	CC1-MRSA-[V+*fus*+*tir*]	1	3.3
CC5	CC5-MRSA-[VI+*fus*+*tir*]	2	6.7
CC6	CC6-MRSA-[V+*fus*]	1	3.3
CC15	CC15-MRSA-[V+*fus*]	6	20.0
CC22	CC22-MRSA-IVa (tst1+), “Gaza Epidemic Strain”	2	6.7
CC30	CC30-MRSA-IVa (PVL+), “WSPP/Southwest Pacific Clone”	1	3.3
CC97	CC97-MRSA-[V+*fus*]	1	3.3
CC121	CC121-MRSA-[V+*fus*] (PVL+)	1	3.3
CC152	CC152-MRSA-[V+*fus*] (PVL+)	2	6.7
CC239	CC239-MRSA-[III+Cd+*ccrC*] (*sasX*-negative), "Middle Eastern Cluster"	1	3.3
	CC239-MRSA-[III+Cd] (*sasX*-negative)	1	3.3
CC1153	CC1153-MRSA-[V+*fus*] (PVL+)	3	10.0

***Tabelle 1*:** Stämme aus Alexandria, auffällig die hohen Raten an PVL- positiven (40%) und Fusidin-resistenten Stämmen (*fus*: 83%) [1].

AS-1, AP-3 Identifizierung von antigenen Strukturen

Die Targets, d.h., die Genprodukte von *mecA* (PBP2a) und *mecC* standen von Beginn an fest, da sie die Methicillin-/Beta-Laktam-Resistenz in *S. aureus* und anderen Staphylokokken verursachen. Der Schritt der Targetdefinition war vor allem wichtig, um die exakten Sequenzen zu definieren, die dann zur Bereitstellung rekombinanter Antigene für die Antikörperherstellung bei den Projektpartnern eingesetzt wurden. Um eventuelle Kreuzreaktivitäten und unspezifische Reaktionen voraussagen zu können, wurden die öffentlich verfügbaren Datenbanken nach ähnlichen Genen durchsucht. Es wurden (außer *mecC*, Nr. 25 und 26 in Abb. 3) keine Sequenzen identifiziert, die ein prinzipielles Problem für das vorliegende Projekt darstellen könnten. Alle von uns oder von Partnern sequenzierten MRSA Stämme und auch alle in öffentlichen Datenbanken hinterlegten MRSA-Genom-Sequenzen hatten *mecA* Allele, die in dem „oberen rot markierten Bereich" des Stammbaums in Abb. 4 liegen, also weder genotypisch noch phänotypisch Probleme verursachen sollten. Bereits früher gemachte Beobachtungen [7] konnten aber anhand der inzwischen viel höherer Zahl publizierter Sequenzen bestätigt werden: Es gibt zwei weitere Cluster (in Abb. 4 grün markiert) nahe verwandter Sequenzen. Einer tritt in *S. vitulinus, S. kloosii* und *S. capitis* auf; der andere in *S. sciuri*. Während beide phylogenetisch untereinander und mit *mecA/C* verwandt sind, sind sie nicht mit Methicillin-/Beta-Laktam-Resistenz assoziiert. Sie sollten also von diagnostischen Tests *nicht* erkannt werden, um Verwirrung zu vermeiden.

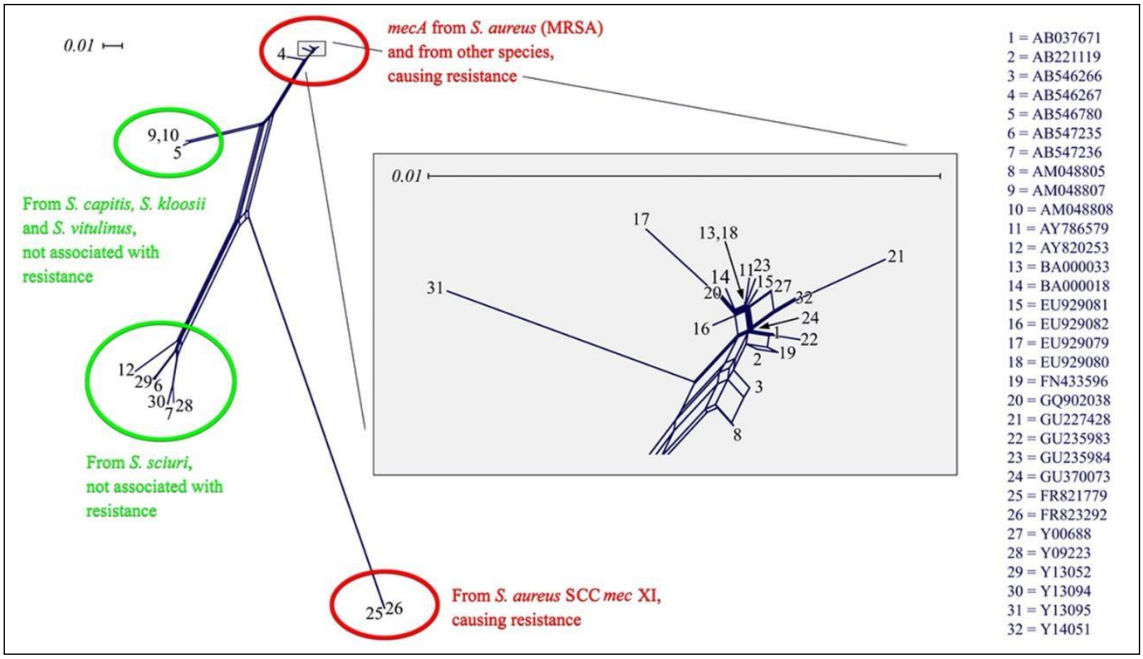


Abbildung 4: Die verschiedenen Varianten von *mec* Genen aus Staphylokokken. Rot- mit beta-Laktam-Resistenz assoziiert und daher klinisch bedeutsam. Grün: verwandte Sequenzen ohne Bezug zu Antibiotikaresistenz (modifiziert aus [7]).

-4: Identifizierung von Peptidsequenzen

Um mögliche Antikörperbindestellen auf dem Protein PBP2a (dem Genprodukt von *mecA*) zu finden, wurde EpiDope, ein Deep Neural Network für die Vorhersage von lineare B-Zell-Epitopen mit der Aminosäuresequenz von *mecA/C* verwendet [8]. Das neuronale Netzwerk verwendet die Aminosäuresequenz des Zielproteins und berechnet einen Konfidenzwert für jede Aminosäure. Dabei werden sowohl der Gesamtkontext des Proteins als auch ein kleinerer Bereich der Proteinsequenz berücksichtigt.

Um robuste Resultate zu gewährleisten, wurde die Vorhersage anhand mehrerer homologer Proteinsequenzen aus verschiedenen MRSA-Stämmen durchgeführt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit unterscheiden sich deren für die Testentwicklung relevanten Epitopsequenzen aber nicht. Eventuelle Unterschiede in der Nukleotidsequenz lagen entweder außerhalb der als potentielle Epitope vorhergesagten Bereiche oder widerspiegelten sich als stille Mutationen nicht in der Aminosäuresequenz. Die so vorhergesagten Epitopsequenzen sind in Tabelle 2 für *mecA* und Tabelle 3 für *mecC* aufgelistet, eine grafische Darstellung wird in Abb. 4 gezeigt.

Um ungewollte Reaktionen möglicher Antikörper gegenüber dem in allen *S.aureus* -Stämmen vorhandenen Protein pbpB auszuschließen, wurden die vorhergesagten Epitopsequenzen für pbp2a und *mecC* Sequenzen mit den Proteinsequenzen von pbpB verglichen. Dabei wurden keine übereinstimmenden Sequenzen gefunden; für die ausgewählten Epitope sind also aus theoretischer Perspektive keine Kreuzreaktionen mit linearen Epitopen der pbpB Proteine zu erwarten, die eventuelle Antikörper-basierte Tests falsch-positiv erscheinen lassen könnten.

Synthetische Peptide auf Basis der ermittelten Epitope könnten auch zur Immunisierung von Versuchstieren verwendet werden, falls eine Herstellung rekombinanter Antigene nicht möglich sollte, was immer auch ein vergleichsweises hohes Risiko bei derartigen Projekten darstellt. Um die vorhergesagten Sequenzen für ein *in vitro* Epitopscreening verwenden zu können, wurden die Sequenzen in 15 Aminosäuren lange Abschnitte zerlegt deren Fenster um jeweils 5 Aminosäuren verschoben wurde. Diese Sequenzen wurden an die Industriepartner weitergegeben, sie könnten synthetisiert und verwendet werden, um die Bindungsstellen der Antikörper zu ermitteln, was z.B. für das Anmelden von etwaigen Patenten relevant wäre.

Locus tag	Start	End	Sequenz	Score
SACOL0033	19	106	GIYFYASKDKEINNTIDAIEDKNFKQVYKDSSYISKSDNGEVEMTERPIKIYNSLGVKDINIQDRKIKKVSKNKKRVDAQYKIKTNYG	0.86
SACOL0033	151	243	RGKILDRNNVELANTGTAYEIGIVPKNVSKKDYKAIAKELSISEDYIKQQMDQNWVQDDTFVPLKTVKKMDEYLSDFAKKFHLTTNETESRNY	0.86
SACOL0033	382	394	KLTEDKKEPLLNK	0.84
SACOL0033	407	442	ILTAMIGLNNKTLDDKTSYKIDGKGWQKDKSWGGYN	0.86
SACOL0033	651	666	KVYDELYENGNKKYDI	0.84

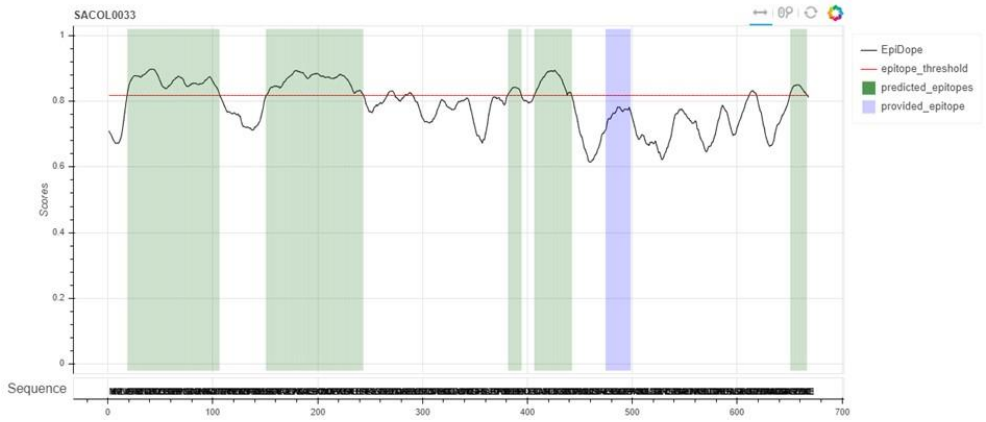
Tabelle 2: Sequenzen der als mögliche Epitopbereiche vorhergesagte Sequenzen für das Genprodukt von *mecA* (PBP2a).

AS-1, AP

Locus tag	Start	Ende	Sequenz	Score
SARLGA251_00260	20	101	WLFKDDDIEKTISSIEKGNYNEVYKNSSEKSKLAYGEEEIVDRNKKIYKDLSVNNLKITNHEIKKTGKDKKQVDVKYNIYTK	0.87
SARLGA251_00260	147	240	ERGKIKDRNGIELAKTGNTYEIGIVPNKTPKEKYDDIARDLQIDTKAITNKVNQKWVQPDSFVPIKKINKQDEYIDKLIKSYNLQINTIKSRVY	0.88
SARLGA251_00260	300	309	NTYDNKPLDT	0.83
SARLGA251_00260	325	340	IDARVQESIYKHMKND	0.82
SARLGA251_00260	409	444	IALKENKLDKNTNFDIYGKGWQKDASWGNYNITRFK	0.88
SARLGA251_00260	543	623	NPHVLRKTKSQIWKKDIIPKKDIDILTNGMERVVNKTHRDDIYKNYARIIGKSGTAELKMNQGETGRQIGWFVSYNKNNPN	0.86
SARLGA251_00260	646	662	SGKVYDDLYDNGKTQFD	0.84

Tabelle 3: Sequenzen der als mögliche Epitopbereiche vorhergesagte Sequenzen für das Genprodukt von *mecC.*

mecA:



mecC:

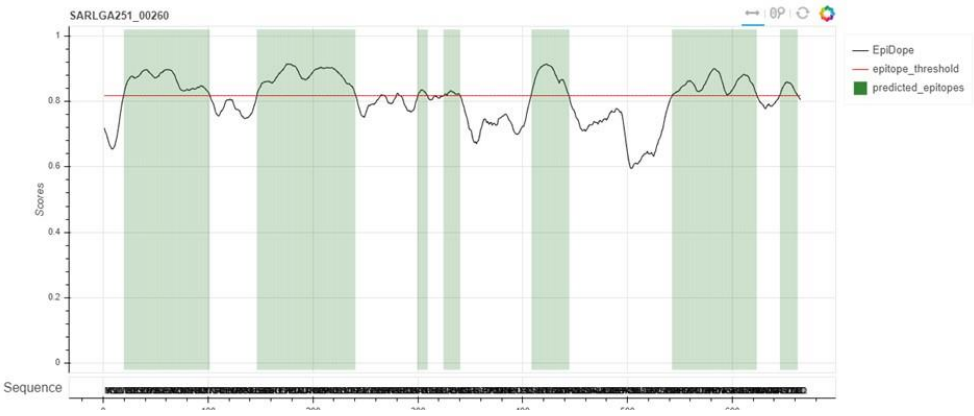


Abbildung 5: Visualisierung für die *mecA*/PBP2a Proteinsequenz aus dem Referenzstamm COL und für das Genprodukt von *mecC* aus LGA251. Die grün hinterlegten Bereiche stellen Bereiche mit erhöhter Konfidenz (Y-Achse) für Epitopregionen dar. In blau markiert ist das bekannte Epitop eines kommerziell erhältlichen Antikörpers gegen PBP2a

-5: Entwicklung eines schonenden Lyseprotokolls

Die *mec*-Genprodukte sind als alternative Penicillin-bindende Proteine in der Zellwand der Grampositiven Staphylokokken verankert, die daher zumindest partiell zerstört werden muss, um sie nachzuweisen. Dies geschieht z.B. durch Erhitzen in Chemikalien (z.B. Natronlauge). Das Verfahren hat den Nachteil, dass andere Proteine dabei denaturiert und hydrolysiert werden und damit ein gleichzeitiger Nachweis von Toxinen oder anderen Resistenzfaktoren unmöglich wird.

Daher war es ein Thema, schonendere Lyse-Verfahren zu erproben, also z.B. den Einsatz von Enzymen oder Bakteriophagen zu evaluieren. Da die Erzeugung monoklonaler Antikörper mittels des Hybridoma-Verfahrens [9] zeitaufwendig ist und um die Projektlaufzeit optimal zu nutzen, wurden zu Beginn für die Testung und Optimierung verschiedener Lyseverfahren kommerziell erhältliche Tests sowie erste (n=5) lateral flow devices (LFD) verwendet, bei denen kommerziell erhältliche PBP-2a-Antikörper von Senova auf Membranen aufgebracht wurden. Letztere haben mit Realproben nicht funktioniert, so daß die Experimente dann mit kommerziell erhältlichen Tests und eigenen Prototypen durchgeführt wurden.

Herausforderungen bei der Forschung an alternativen Lyseprotokollen sind der Preis (insbesondere bei Lysostaphin) und die Tatsache, dass Lateral-Flow-Tests pH-sensitiv sind, also dass manche Puffer zu falsch-positiven Ergebnissen führen können. Gleich zu Beginn waren wir hier mit der Herausforderung konfrontiert, daß bei den PBP2a-LFDs starke falsch-positive Reaktionen nur durch die verwendeten Puffer sichtbar waren. Nach umfangreichen Versuchsreihen und Austestung vieler verschiedener Puffer und unterschiedlicher Salzkonzentrationen, wurde erkennbar, daß die falsch-positiven Reaktionen stark abhängig von pH-Wert – und auch Salzkonzentration – waren. Nach diesen Versuchsreihen wurden zwei Puffer ausgewählt, die keine falsch-positiven Reaktionen zeigten und die als Lysepuffer für die verschiedenen Lyseprotokolle verwendet werden konnten.

Abbildung 6: Das Beispielexperiment zeigt, daß allein die Konzentration des Phosphatpuffers, und der daraus resultierende pHWert der auf die Testkasette pipettierten Lösung das Ergebnis beeinflusst, also hier falsch-positive Ergebnisse hervorbringt.

AS-1, AP

Im Rahmen des Projektes wurden verschiedene thermische, chemische und enzymatische Lyseverfahren geprüft und im Hinblick auf ihre Kompatibilität in Verwendung mit den LFDs ausgetestet.

Weiterhin wurde auch die Lyse mittels lytischer Phagen als erprobt. Es wurden mehrere (n=5) lytische und *S. aureus* spezifische Bakteriophagen untersucht. Im Prinzip ist eine Präparation der *mec*-Genprodukte mit Phagen möglich (Abb. 5). Es gibt aber Probleme, die im Rahmen des Projektes nicht gelöst werden können. Erstens sind Phagen hochspezifisch, so dass um falschnegative Ergebnisse zu vermeiden, Phagen-„Cocktails“ aus mehreren Phagen verwendet werden müssten. Allein dies erfordert ein umfangreiches Screening einer sehr großen Phagensammlung und wäre ein zusätzliches Projekt. Zweitens, Phagen werden naturgemäß in *S. aureus*-Kulturen angezüchtet und eventuelle Rückstände von *mec*-Genprodukten oder anderen StaphylokokkenProteinen könnten Testergebnisse verfälschen, und gerade beim Hinzufügen anderer Targets in einer künftigen Testentwicklung könnte dies das Screening noch deutlich erschweren. Daher erscheint der Einsatz von Phagen zur Präparation zwar möglich, aber ohne eine umfangreiche vorhergehende Produktentwicklung nicht ohne weiteres praktikabel für Routineanwendungen.

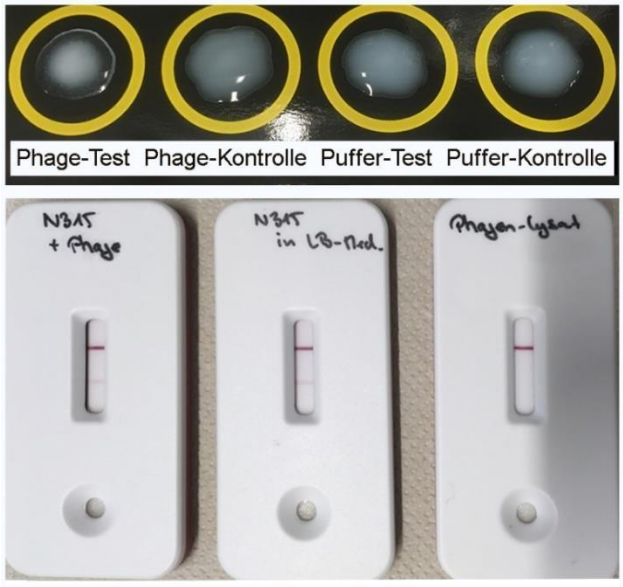


Abbildung 7: Experimente mit einem Phagen und dem MRSA Stamm N315 (LB ist ein zur Anzucht verwendetes Medium). Positiv sind ein Ausflocken (links oben) im kommerziell erhältlichen Agglutinationstest, bzw. das Auftreten von zwei Banden im Lateral-Flow Test.

Chemische Verfahren sind daher leichter einsetzbar, ökonomischer und, auch mit Hinblick auf Stabilität und Lagerbarkeit, besser zu standardisieren. Das Hauptproblem dabei war die pHAbhängigkeit der Lateral-Flow-Tests (Abb. 6) und der Verzicht auf das Erhitzen, was durch die entfallende Denaturierung zwar einen zukünftigen Nachweis anderer Targets ermöglicht, aber auch zu falsch-positiven Ergebnissen führt. Dies erforderte das Testen zahlreicher Puffer und Konzentrationen dieser Puffer (Abb. 6), verschiedener „blocking“-Reagenzien, umfangreiche Verdünnungsreihen und Abstufungen bei Inkubationszeiten. Als Ergebnis wird jetzt eine

chemische Lyse bei Raumtemperatur durchgeführt, bei der der Einsatz von „blocking“Reagenzien falsch-positive Ergebnisse unterdrückt. Dieses Protokoll wurde dann in routinenahen Experimenten eingesetzt und optimiert.

-6: Testung der ersten Testprototypen

Das Screening der Hybridoma-Klone [9] erfolgte beim Partner (fzmb), Antikörperpräparationen wurden an Senova übergeben und als Lateral-Flow-Test konfektioniert.

Sobald die ersten LFD-Prototypen mit den fzmb-AKs hergestellt waren, wurden diese von Senova dem IPHT zur Verfügung gestellt und am IPHT zuerst in Leerwert-Tests mit verschiedenen Puffern und danach mit den bei diesen Tests ermittelten Puffer- Kombinationen mit Realproben aus AP-1 getestet. Insgesamt wurden im Projektverlauf 26 verschiedene *mecA*-LFD-ProtypVarianten und 2 *mecC*-LFD-Prototypen mit Realproben unter verschiedenen Bedingungen getestet. Gemeinsam mit Senova wurden Ergebnisse ausgewertet und weitere Schritte abgestimmt, mit Hinblick auf unterschiedliche Antikörperkonzentrationen auf der Membran, unterschiedliche Konjugat-Konzentrationen, verschiedene Konjugat-Partikel, verschiedene Blocking-Varianten und Abstufungen der Konzentrationen der Blocking-Reagenzien. Alle LFDZwischen-Varianten mit Realproben getestet und die nächsten Schritte abgeleitet und es wurden auch LFDs mit PE-Membranen vom fzmb getestet.

Nach Auswertung dieser Experimente wurden mit dem Industriepartner (Senova) die endgültigen Antikörperkonzentrationen festgelegt sowie ein verbindliches, finales Protokoll erstellt, daß dann an die Partner für das nächste Arbeitspaket weitergeleitet wurde (siehe unten, AP-7).

Außerdem wurden die Partner, die nicht über Labors für infektiöse Arbeiten verfügen (S2) unterstützt, wenn es darum ging, Kulturen anzuziehen und zu inaktivieren, Probematerial zur Verfügung zu stellen oder Resistenztestungen durchzuführen. -Dies beinhaltete insbesondere die Unterstützung des Projektpartners Senova bei ihrem Arbeitspaket „Test-Validierung“, da die Testung von Realproben ausschließlich in S2Labors durchgeführt werden kann.

Am Ende der Arbeiten standen zwei LFD-Varianten mit den gleichen Antikörpern aber mit zwei unterschiedlichen Nanopartikeln („rot“ und „blau“, Abb.7), die dann auch für weitere Testungen und zur Erprobung durch potentielle Anwender (s.u.) zum Einsatz kamen. Zuletzt wurden 60 mittels Mikroarray (siehe oben, AP-1/-2) charakterisierte Isolate durchgetestet. Diese Arbeit wurden auf dem Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, September 2023 in Lübeck als Studie an 60 Isolaten vorgestellt (Anhang 2).

AS-1, AP

Abbildung 7: „Rote“ und „blaue“ Testkasette (mit verschiedenen Nanopartikeln) im Test mit dem mecA-negativen (MSSA) Referenzstamm Sanger 476 und dem MRSA USA300-TCH1516.

Die Erprobung beider („roter“ und „blauer“) Varianten des LFD mit einigen Isolaten anderer Spezies (Tabelle 4) entsprach den Erwartungen, das heißt *mecA*-positive Isolate reagierten im LFD, *mecA*-negative taten es nicht, und die Spezieszugehörigkeit hatte keinen Einfluß auf das Ergebnis. Dies zeigt, daß ein künftiges kommerzielles Produkt um einen speziesspezifischen Marker für *S. aureus* erweitert werden könnte um Verwechslungen zu minimieren.

Spezies / SCC element	*mecA*-Status (Microarray)	Nachweis von PBP2a (LFD)
Staphylococcus epidermidis	positiv	positiv
Staphylococcus epidermidis	positiv	positiv
Staphylococcus epidermidis	positiv (SCC*mec* IV)	positiv
Staphylococcus epidermidis	negativ (SCC[ACME+*ccrAB*4])	negativ
Staphylococcus haemolyticus	negativ	negativ
Staphylococcus haemolyticus	positiv (SCC*mec* V/VT composite)	positiv
Staphylococcus hominis ssp hominis	negativ	negativ
Staphylococcus warneri	negativ	negativ
Staphylococcus xylosus	negativ	negativ
Streptococcus pneumoniae	negativ	negativ

Tabelle 4: Experimente mit Kulturmaterial anderer Spezies

Spezies	mec-Allel (Nomenklatur nach [7])	Mit OxacillinResistenz assoziiert	Nachweis von PBP2a (LFD)
Staphylococcus fleurettii	Aureus COL CP000046.1	ja	positiv
Staphylococcus saprophyticus	Aureus COL CP000046.1	ja	positiv
S. pseud-/intermedius/lutrae	Aureus N315 BA000018.3	ja	positiv
Staphylococcus fleurettii	Aureus N315 BA000018.3, Variante	ja	positiv
Staphylococcus haemolyticus	Aureus N315 BA000018.3, Variante	ja	positiv

Staphylococcus pseudintermedius	Aureus N315 BA000018.3, Variante	ja	positiv
S. aureus CC130-MRSA-XI (3 Isolate)	Aureus *mecC*, FR821779/FR823292	ja	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri AY820253	nein	negativ
Staphylococcus simulans	Sciuri AY820253	nein	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri AY820253, Variante	nein	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri Y09223	nein	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri Y09223	nein	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri Y130052/AB547235/Y13094	nein	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri Y13094	nein	negativ
Staphylococcus sciuri	Sciuri Y13094	nein	negativ
Staphylococcus vitulinus	Vitulinus AB546780	nein	negativ
Staphylococcus vitulinus	Vitulinus AB546780	nein	negativ

Tabelle 5: Experimente mit Stämmen, die verschiedene *mec*-Allele tragen.

Des Weiteren wurden Stämme mit verschiedenen Varianten von *mec*-Genen getestet (Tabelle 5), um zu zeigen, daß auch nur die *mecA*-Varianten vom Test positiv erkannt werden, die auch phänotypisch zu einer Resistenz führen (siehe oben, AS-1, AP-3, und [7]). Das Genprodukt von *mecC* in drei verschiedenen, durch Mikroarray und Sequenzierung bestätigten, klinischen Isolaten von CC130-MRSA-XI wurde nicht erkannt. Ansonsten stimmten die Testergebnisse, unabhängig von der Spezieszugehörigkeit, mit den erwarteten Befunden überein

Zuletzt wurden „proof-of-principle" Experimente durchgeführt, bei dem außer dem *mecA*Genprodukt noch ein Speziesmarker für *S. aureus* nachgewiesen wird. Dies soll die Möglichkeit falschpositiver MRSA-Identifizierungen aufgrund von falsch identifizierten Spezies oder Verwechslungen von Kulturen in der Routine verringern. Dies erscheint machbar (Abb. 8) aber das Vorkommen schwacher falsch-positiver Banden in einigen Experimenten zeigt, dass nach Hinzufügen zusätzlicher Targets eine erneute Optimierung von Puffern und Protokoll vor der CEIVD-Zulassung notwendig wird oder werden kann.

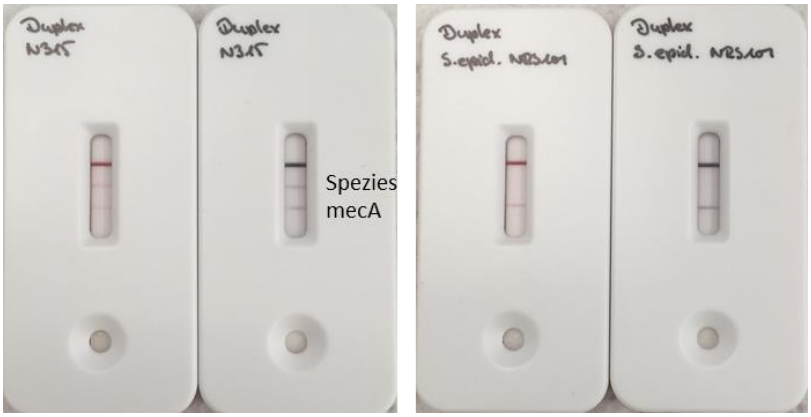


Abbildung 8: „Rote" und „blaue" Testkasette (mit verschiedenen Nanopartikeln) im Test mit dem MRSA-Stamm N315 und dem *mecA*-positiven *S. epidermidis* NRS101.

Experimente mit dem „*Dot Diver*" des Industriepartners (Generic Assay) konnten nicht durchgeführt werden, trotz mehrfacher Anfragen und Diskussion des Themas wurde uns kein Gerät zur Verfügung gestellt. Der Partner besitzt kein Labor der Sicherheitsstufe 2 um *S. aureus*Kulturen selber handhaben zu können und eine Übergabe abgetöteter Bakterienpräparationen wurde nicht angefordert.

Was das *mecC*-Genprodukt betrifft, der Partner (fzmb) lieferte sieben Antikörper. Alle wurden mit rekombinantem Antigen auf Proteinmikroarrays gescreent. Ein Antikörper-Paar ergab deutlich positive Ergebnisse. Auf Lateral-Flow-Kassetten wurden positive Reaktionen nur mit rekombinanten, aber nicht mit nativem Antigen beobachtet. Dabei wurden mehrere unterschiedliche *mecC*-MRSA-Stämme mit verschiedenen Protokollen verwendet. Auch eine Anzucht/Passagierung der Stämme auf Antibiotika-haltigen Nährböden, um die Expression des *mecC*-Genprodukts zu verstärken, brachte leider trotz umfangreicher Versuche keinen Erfolg.

AS-1, AP-7: Feedback medizinscher Anwender

Um eine realistische Einschätzung der Performance des experimentellen Tests zu erhalten, um über eventuelle Probleme zu erfahren und eventuelle „Problemstämme" zu erhalten, wurden zwei verschiedene Varianten des Lateral-Flow-Test an klinische/veterinärmedizinische Diagnostik

betreibende Partnereinrichtungen weitergegeben und diese gebeten, ihn parallel zu ihren Standardverfahren mit durchzuführen. Es konnten für diese Arbeiten fünf externe Teilnehmer / diagnostische Labore gewonnen werden. Dabei handelte es sich um zwei Labors deutscher Unikliniken, ein Labor eines deutschen Kreiskrankenhauses und zwei Labore veterinärmedizinischer Maximalversorgung, je eines in Deutschland und in Österreich. übergeben, um eine praxisnahe Erprobung unter Routinebedingungen durchzuführen.

Die Erprobung ergab zufriedenstellende Ergebnisse. 36 der mitgeteilten Datensätze wurden nicht berücksichtigt, weil die Speziesidentifikation im Nachhinein korrigiert wurde (n=6), Referenzdaten fehlten (n=14), oder ein Bedienfehler erkannt wurde (n=16). Von den verbliebenen 374 Isolaten wurden 275 korrekt positiv und 91 korrekt negativ bestimmt. Letztere beinhalteten 3 bestätigte *mecC*-MRSA-Fälle. Es gab 5 „fragliche“ Ergebnisse. In vier Fällen waren dies extrem schwache Banden, die von einem Ablesenden als positiv benannt und einem zweiten Ablesenden nicht gesehen wurden, und in einem Fall gab es diskrepante Mehrfachuntersuchungen. Des weiteren gab es ein falsch-negatives Ergebnis. Dabei handelte es sich vermutlich um eine Stammverwechslung (positiv bei Wiederholung). Zwei Isolate ergaben falsch-positive Ergebnisse. Sie wurden zur Nachuntersuchung per Mikroarray angefordert, ein Isolat existiert noch und wurde vom Anwender eingesandt. Es soll dieser Tage genotypisiert werden.

Das ergibt (die „fraglichen“ als falsch negativ und die *mecC*-positiven als „richtig *mecA*-negativ“ gewertet), eine Spezifität von 0,978, eine Sensitivität von 0,979, einen positiven prädiktiven Wert von 0,993 und einen negativen prädiktiven Wert von 0,938.

Die Ergebnisse beider („roter“ und „blauer“) Varianten des Tests korrelierten in allen Fällen, in denen beide parallel an einem Isolat durchgeführt wurden.

Verbal wurde von zwei Teilnehmern mitgeteilt, dass der Test etwas arbeitsaufwendiger sei, als bestehende Produkte. Dieser potentielle Nachteil könnte durch einen zweiten, auf dem gleichen Teststreifen nachzuweisenden Marker (wie z.B. das Toxin PVL, dessen Nachweis in MRSA in Sachsen meldepflichtig ist), kompensiert werden. Dies wird durch den Einsatz eines schonenden Lyseverfahrens überhaupt erst möglich. Auch diese Information wurde dem Industriepartner mitgeteilt, um sie bei künftigen Testentwicklungen zu berücksichtigen. Ein weiterer Punkt, der dem Partner mitgeteilt wurde, ist die Frage der Standardisierung, wieviel Bakterienmaterial „eine Impföse voll“ genau ist, was gewisse individuelle Schwankungen ausmacht und der Grund für die als „fraglich“ beschriebenen Ergebnisse sein dürfte. Dies ist aber ein Problem der an das Forschungsprojekt anschließenden Produktentwicklung.

1.2. Erfüllung der Meilensteine

Das Ziel des Halbzeitmeilensteines (HZM) war das Anlegen einer Stammsammlung von mindestens 100 MRSA Stämmen für Testzwecke. Das Ziel wurde, mit 370 *mecA*-MRSA und 7 *mecC*-MRSA, übererfüllt.

2. Die wichtigsten Positionen des zahlenmäßigen Nachweises

Die Ausgaben erfolgten auf Basis der geplanten Arbeiten in den jeweiligen Arbeitspaketen. Der zahlenmäßige Nachweis (samt Anlagen) wurde Ihnen seitens unserer Finanzbuchhaltung am 08.05.2024 übersandt. Anbei eine kurze Zusammenfassung der wichtigsten AZA-Positionen:

-	0812 wiss. Personal:	97.551,89 €
-	0843 Sachmittel:	82.813,67 €
-	0846 Dienstreisen:	2.550,49 €
-	0850 Investitionen:	2.783,95 €
	Gesamtausgaben	**185.700,00 €**

3. Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit

Die klinische und krankenhaushygienische Relevanz von MRSA macht eine zuverlässige, ökonomische und schnelle Diagnostik notwendig. In der Routine werden Patientenmaterialien zur Diagnostik von Infektionen oder Screeningabstriche neu aufgenommener Patienten auf Nährböden ausgestrichen. Angewachsene Bakterien werden identifiziert. Falls klinisch relevant, werden Resistenztestungen mit einem Panel von unterschiedlichen Antibiotika, bei denen dann eine verdächtige Methicillin-/Oxacillin-/Cefoxitinresistenz auffallen kann, durchgeführt. Wenn dabei derart resistente *S. aureus* gefunden werden, ist es aufgrund der Konsequenzen für Therapie und Hygiene-Regime zwingend erforderlich, Verdachtsfälle mit einer zweiten und unabhängigen Methode als Bestätigungstest abzusichern. Dafür gibt es einige kommerziell erhältliche Tests von Herstellern in Übersee (Denka-Seiken, Abbott, BD). Ein Nachteil aktueller MRSA-Bestätigungstests verwendete Lyseverfahren für den gleichzeitigen Nachweis anderer *S. aureus* Proteine ungeeignet, da sie diese chemisch und thermisch denaturieren. Der zusätzliche Nachweis weiterer Marker erfordert einen Aufschluss, der weniger aggressiv verläuft, so dass auch weitere, strukturempfindliche und ggf. sekretierte Proteine nachgewiesen werden können. Die Notwendigkeit und Angemessenheit der geleisteten Arbeit ergibt sich aus der klinischen Relevanz anderer Virulenz- und Resistenzfaktoren des Erregers, die Forschung zur Diagnostik dieser Marker notwendig macht, und aus den hinlänglich bekannten Problemen der Resilienz, der Sicherheit der Lieferketten und der Wertschöpfung in der Region.

4. Darstellung des voraussichtlichen Nutzens

Die gewonnenen Ergebnisse erlauben dem Industriepartner direkt unter Verwendung der getesteten Antikörper und der optimierten Testprotokolle zur Produktentwicklung überzugehen. Die schonende Lyse ermöglicht das Hinzufügen weiterer Targets in die Testkasette, mögliche Kandidaten wären ein Speziesmarker als zusätzliche Kontrolle und als Marker hoher Priorität (siehe AP-1/-2), PVL und/oder das Genprodukt von *fusC*.

Die Frage nach einem möglichen Schnelltest für das Genprodukt von *mecC* bleibt ein ungelöstes Problem. Es ist zwar selten (3 bestätigte Fälle auf 374 Isolate), aber es gibt nach wie vor nur genotypische Methoden zur Bestätigung eines Verdachts.

5. Während der Durchführung des Vorhabens bekannt gewordener Fortschritt auf dem Gebiet des Vorhabens bei anderen Stellen

Im Projektzeitraum sind keine neuen Ansätze für die im Teilprojekt bearbeiteten Themen bekannt geworden.

6. Erfolgte oder geplante Veröffentlichungen des Ergebnisses

Die Arbeiten führten, wie bereits erwähnt, zu sechs Veröffentlichungen (Anhang 1; [1-6]). Eine sechste befindet sich gegenwärtig im peer-review-Prozess. Außerdem wurden Ergebnisse als

Posterpräsentation auf dem DGHM Kongress in Lübeck vorgestellt (Anhang 2). Eine finale Veröffentlichung der Arbeiten zum LFD wird derzeit mit den Industriepartnern diskutiert.

Anhang 1: Literatur

1. Monecke, S.; Bedewy, A.K.; Müller, E.; Braun, S.D.; Diezel, C.; Elsheredy, A.; Kader, O.; Reinicke, M.; Ghazal, A.; Rezk, S., et al. Characterisation of Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus from Alexandria, Egypt. *Antibiotics (Basel)* **2023**, *12*, doi:10.3390/antibiotics12010078.
2. Monecke, S.; Akpaka, P.E.; Smith, M.R.; Unakal, C.G.; Thoms Rodriguez, C.A.; Ashraph, K.; Müller, E.; Braun, S.D.; Diezel, C.; Reinicke, M., et al. Clonal Complexes Distribution of Staphylococcus aureus Isolates from Clinical Samples from the Caribbean Islands. *Antibiotics (Basel)* **2023**, *12*, doi:10.3390/antibiotics12061050.
3. Burgold-Voigt, S.; Monecke, S.; Busch, A.; Bocklisch, H.; Braun, S.D.; Diezel, C.; Hotzel, H.; LieblerTenorio, E.M.; Müller, E.; Reinicke, M., et al. Characterisation of a Staphylococcus aureus Isolate Carrying Phage-Borne Enterotoxin E from a European Badger (Meles meles). *Pathogens* **2023**, *12*, doi:10.3390/pathogens12050704.
4. Monecke, S.; Braun, S.D.; Collatz, M.; Diezel, C.; Müller, E.; Reinicke, M.; Cabal Rosel, A.; Feßler, A.T.; Hanke, D.; Loncaric, I., et al. Molecular Characterization of Chimeric Staphylococcus aureus Strains from Waterfowl. *Microorganisms* **2024**, *12*, doi:10.3390/microorganisms12010096.
5. Monecke, S.; Roberts, M.C.; Braun, S.D.; Diezel, C.; Müller, E.; Reinicke, M.; Linde, J.; Joshi, P.R.; Paudel, S.; Acharya, M., et al. Sequence Analysis of Novel Staphylococcus aureus Lineages from Wild and Captive Macaques. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms231911225.
6. Tuchscherr, L.; Wendler, S.; Santhanam, R.; Priese, J.; Reissig, A.; Müller, E.; Ali, R.; Müller, S.; Löffler, B.; Monecke, S., et al. Reduced Glycolysis and Cytotoxicity in Staphylococcus aureus Isolates from Chronic Rhinosinusitis as Strategies for Host Adaptation. *Int J Mol Sci* **2024**, *25*, doi:10.3390/ijms25042229.
7. Monecke, S.; Müller, E.; Schwarz, S.; Hotzel, H.; Ehricht, R. Rapid microarray based identification of different mecA alleles in Staphylococci. *Antimicrob Agents Chemother* **2012**, *56*, 5547-5554, doi:10.1128/AAC.00574-12.
8. Collatz, M.; Mock, F.; Barth, E.; Hölzer, M.; Sachse, K.; Marz, M. EpiDope: a deep neural network for linear B-cell epitope prediction. *Bioinformatics* **2020**, *37*, 448-455, doi:10.1093/bioinformatics/btaa773.
9. Köhler, G.; Milstein, C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **1975**, *256*, 495-497, doi:10.1038/256495a0.

Anhang 2: Poster zum Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie, September 2023, Lübeck.

GEFÖRDERT VOM

Design, development and verification of a new Lateral Flow Assay for the fast and direct detection of PBP2a from clonal cultures of *Staphylococcus aureus*

Elke Müller[1,2], Stefan Monecke[1,2,4], Theresa Heckmann[5], Hans-Herman Söffing[5], Kathrin Franke[6], Katrin Frankenfeld[7] and Ralf Ehricht[1,2,3]

[1]Leibniz-Institute of Photonic Technology (Leibniz-IPHT), Jena, Germany, member of the Leibniz Center for Photonics in Infection Research (LPI), Jena, Germany; [2]InfectoGnostics Research Campus, Centre for Applied Research, Jena, Germany; [3]Friedrich Schiller University Jena, Institute of Physical Chemistry, Jena, Germany; [4]Institute for Medical Microbiology and Virology, Dresden University Hospital, Dresden, Germany; [5]Senova Gesellschaft für Biowissenschaft und Technik mbH, Weimar, Germany; [6]fzmb GmbH, Forschungszentrum für Medizintechnik und Biotechnologie, Erfurt, Germany; [7]INTER-ARRAY, Research Center for Medical Technology and Biotechnology (fzmb GmbH), Bad Langensalza, Germany;

Introduction

Since the initial therapy of staphylococcal infections often relies on beta-lactams, methicillin resistance, accompanied by resistance to almost all β-lactams in clinical use, has become increasingly common in *Staphylococcus aureus* worldwide. It is associated with a higher mortality and increased costs to healthcare systems, and infection control measures such as isolation of affected patients and barrier nursing are warranted. Resistance is caused by an alternate penicillin-binding protein (PBP2' or PBP2a) encoded by the gene *mecA*. Because of the high clinical impact of methicillin/β-lactam resistance on therapeutic decisions and infection control measures, newly identified MRSA cases need to be confirmed by a second method. This includes molecular means (i.e., PCR for the detection of *mecA/C*) or a detection of the PBP2a protein.

Materials and Methods

A new Lateral-Flow (LF) assay was developed that allows the detection of MRSA strains quickly and cost-effectively, without special laboratory equipment, directly from culture plates. Monoclonal antibodies were produced by immunizing mice with recombinant PBP2a antigen and screened against the antigen. Lateral flow assays were prepared using the best pair of antibodies identified. Staphylococcal cells were harvested directly from overnight cultures on Columbia blood agar and inoculated in a designated buffer. After incubation at room temperature, the bacterial suspension was applied directly to the LF assay. Following an extensive protocol optimization using fully characterised reference strains, the lateral flow assays were tested with 60 clinical isolates. All isolates were also genotyped using microarrays (Inter-Array GmbH, Bad Langensalza, Germany) which allowed the determination of their *mecA*/SCC*mec* carriage as well as the assignment to clonal complexes and epidemic strains.

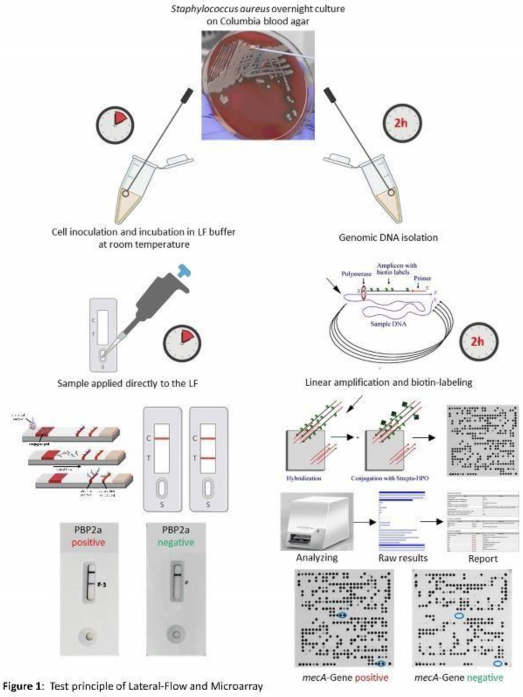


Figure 1: Test principle of Lateral-Flow and Microarray

Table 1: Strain test panel – a comparison of microarray genotyping and LF results

No.	Genotyping result	mecA Genotype	PBP2a-Lateral-Flow result	Correctly detected by LF
01	CC1-MSSA-[fus+ccrAB1]	negative	negative	yes
02	CC8-MRSA-[IVa+ACME1]_[PVL+]_USA300	positive	positive	yes
03	CC5-MRSA-II (sL1+), New York-Japan Clone	positive	positive	yes
04	CC5-MRSA-II (sL1+), New York-Japan Clone	positive	positive	yes
05	CC22-MRSA-IV_[fmbB+,sec/l+]_UK-EMRSA-15/Barnim_EMRSA	positive	positive	yes
06	CC5-MSSA	negative	negative	yes
07	CC30-MSSA	negative	negative	yes
08	CC2817-MRSA-V	positive	positive	yes
09	CC5-MRSA-[NovelSCCmec], Montreal strain II	positive	positive	yes
10	CC8-MRSA-[IVe+tusecrC]	positive	positive	yes
11	CC22-MRSA-[IV+ccrAB4]	positive	positive	yes
12	CC425-MSSA	negative	weak positive	no
13	ST3580/3609-MSSA (lukF-P83/lukM+)	negative	negative	yes
14	ST350-MSSA, lukM/lukF-P83	negative	negative	yes
15	CC8-MSSA	negative	negative	yes
16	St126/hap	negative	negative	yes
17	CC398-MRSA-V/VT	positive	positive	yes
18	CC398-MRSA-V/VT	positive	positive	yes
19	S.sciuri, SCCmec III without sppQ, mecA+	positive	positive	yes
20	CC97-MRSA-[V/VT+fus]	positive	positive	yes
21	CC398-MRSA-V/VT	positive	positive	yes
22	CC398-MRSA-V/VT	positive	positive	yes
23	S.epid [ACME+ccrAB4],mecA-	negative	negative	yes
24	S.haem.,SCCmec V/VT composite element,mecA+	positive	positive	yes
25	S.epid.,SCCmec IV, mecA+	positive	positive	yes
26	CC20-MSSA	negative	negative	yes
27	CC20-MSSA	negative	negative	yes
28	CC20-MSSA	negative	negative	yes
29	CC45-MRSA-IVa,_Berlin_EMRSA	positive	positive	yes
30	CC8-MSSA-[apcE+arcC+ccrAB4]	negative	negative	yes
31	CC182-MSSA	negative	negative	yes
32	CC7-MRSA-IV	positive	positive	yes
33	CC97-MSSA	negative	negative	yes
34	CC9-MSSA	negative	negative	yes
35	CC6-MRSA-IV,_WA_MRSA-51	positive	positive	yes
36	CC1-MRSA-IV_[PVL+]_USA400	positive	positive	yes
37	CC121-MSSA_[PVL+]	negative	weak positive	no
38	CC15-MSSA_[PVL+]	negative	weak positive	no
39	CC152-MRSA-V/VT_[PVL+]	positive	positive	yes
40	CC25-MSSA [PVL+]	negative	negative	yes
41	CC398-MRSA-VT [PVL+]	positive	positive	yes
42	CC5-MSSA_[PVL+]	negative	negative	yes
43	CC5-MRSA-IV [PVL+]	positive	positive	yes
44	ST5/ST225-MRSA-II, Rhine-Hesse_EMRSA/New_York-Japan_Clone	positive	positive	yes
45	CC45-MRSA-IVa,_Berlin_EMRSA	positive	positive	yes
46	CC80-MRSA-IVc [PVL+]	positive	positive	yes
47	CC22-MSSA_[PVL+]	negative	weak positive	no
48	CC45-MSSA	negative	weak positive	no
49	CC22-MSSA	negative	negative	yes
50	CC772-MSSA	negative	negative	yes
51	CC152-MSSA_[PVL+]	negative	negative	yes
52	CC59-MSSA	negative	weak positive	no
53	CC5-MRSA-I_South_German_EMRSA/Italian_Clone	positive	positive	yes
54	CC30-MSSA_[PVL+]	negative	negative	yes
55	CC20-MRSA-V	positive	positive	yes
56	CC30-MRSA-IV_[PVL+]_Southwest_Pacific_Clone	positive	positive	yes
57	CC398-MSSA	negative	negative	yes
58	CC59-MRSA-VT (ermB+/aphA3+/PVL+), Taiwan Clone	positive	positive	yes
59	CC15-MRSA-[V+fus]	positive	positive	yes
60	CC121-MRSA-[V/VT+fus] [PVL+]	positive	positive	yes
		mecA positive = 32	PBP2a positive = 38	sensitivity 100%
		mecA negative = 28	PBP2a negative = 22	specificity 78.6 %

Results

The test panel consisted of 29 MRSA, 3 coagulase negative Staphylococci (CNS) carrying the *mecA* gene, 27 MSSA isolates and one CNS without *mecA*. The MRSA and MSSA strains belonged to 27 different clonal complexes and sequence types. The results of genotyping and lateral flow assay were compared. All 32 *mecA* positive strains were detected by the lateral flow assay yielding strongly coloured bands. Of the 28 MSSA strains, six gave false positive signals although the bands in the LF assay were very weak. The LF assay thus achieved a diagnostic sensitivity and specificity of 100% and 79%, respectively.

Conclusions

The antibodies used were found to be suitable for the task, although the concentrations and details of the protocol still need to be slightly modified to reduce false positivity. The design as a LF assay in combination with a gentle lysis protocol that does not rely on boiling allows for the future addition of species-specific control markers as well as of other targets of interest, such as PVL.

This work is supported by the BMBF funding program Photonics Research Germany (LPI BT5 Leibniz IPHT 13N15717) and is integrated into the Leibniz Center for Photonics in Infection Research (LPI). The LPI initiated by Leibniz IPHT, Leibniz HKI, UKJ and FSU Jena is part of the BMBF national roadmap for research infrastructures.

13GW0422C

Contact:
elke.mueller@leibniz-ipht.de
stefan.monecke@leibniz-ipht.de
ralf.ehricht@leibniz-ipht.de

www.leibniz-ipht.de