



金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 核酸检测试剂盒（荧光PCR法）说明书

【产品名称】

通用名称：金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒（荧光PCR法）

【包装规格】

48人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测痰液样本中金黄色葡萄球菌及耐甲氧西林金黄色葡萄球菌。
金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus, SA, 简称金葡）是医学上重要的致病菌，可引起多种感染类型多样，耐药率高，特别是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（methicillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA）的感染呈多重耐药，病死率较高，已成为临床抗感染治疗的难点。本试剂盒可用于金黄色葡萄球菌及其耐甲氧西林菌株感染的辅助诊断及疗效监控。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）及荧光标记探针技术，快速检测临床样品中金黄色葡萄球菌（简称金葡，Staphylococcus aureus, SA）特有的耐热核酸酶基因（nuc）和耐甲氧西林编码基因（mecA），从而判断金黄色葡萄球菌及其耐甲氧西林菌株的存在。该试剂盒中使用尿嘧啶-N-糖基化酶和dUTP，有助于避免扩增产物的污染。

【主要组成成分】

组成成分	规格和数量	主要成分
10×浓缩清洗液 A	5mL×1瓶	氢氧化钠溶液（NaOH）等
10×浓缩清洗液 B	20mL×1瓶	三羟甲基氨基甲烷与盐酸的混合溶液（Tris-HCl）和乙二胺四乙酸（EDTA）
提取固形物	48 管	/
SA-PCR 反应液	1.1mL×2管	缓冲液（Buffer）、探针、引物、氯化镁（MgCl ₂ ）、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）
mecA-PCR 反应液	1.1mL×2管	缓冲液（Buffer）、探针、引物、氯化镁（MgCl ₂ ）、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）
Taq DNA Polymerase(5U/μL)	50μL×1管	/
Uracil N-Glycosylase(UNG)(1U/μL)	20μL×1管	/
内参照	1mL×1管	含有内参照基因的质粒
阴性对照	1mL×1管	三羟甲基氨基甲烷与盐酸的混合溶液（Tris-HCl）和乙二胺四乙酸（EDTA）
阳性对照（MRSA）	1mL×1管	含有目的基因的质粒

注：阳性对照品为含目的基因的质粒，目的基因来自美国菌种保藏中心（ATCC）的原始菌株。
不同批号的试剂盒请勿混用。

【储存条件及有效期】

储存条件：-20℃保存，有效期8个月；

开封后置于2~8℃保存，请于一周内使用；避免反复冻融（冻融次数少于5次）。

运输条件：低温运输，长途运输应使用冰袋。

生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

ABI7500、STRATAGENE Mx3000P 荧光PCR仪。

【样本要求】

- 适用标本类型：痰液。
 - 若样本初始浓度较低，建议可以先对初始样本进行增菌后检测。
 - 标本采集：清晨从肺深部咳出的痰液，用无菌玻璃管收集1-3mL，密闭送检。
- 注：样本采集前24小时内禁止使用呼吸道外用药（药膏、喷剂、滴剂）。

【检验方法】（使用前请仔细阅读本操作流程）

一、试剂准备（试剂准备区）

- 取出10×浓缩清洗液A和10×浓缩清洗液B，用无菌纯水按1：9（体积比）进行稀释，放于4℃冰箱中备用。
- 将Taq DNA Polymerase和Uracil N-Glycosylase(UNG)瞬时离心后，放于-20℃冰箱中备用。
- 确定需要进行的反应管数n（标本数+阴性、阳性对照）后，取出SA-PCR反应液/mecA-PCR反应液，将n×44.3μL SA-PCR反应液/mecA-PCR反应液，n×0.5μL Taq DNA Polymerase和n×0.2μL Uracil N-Glycosylase(UNG)加入一个离心管中并振荡混匀，瞬时离心后，向每一个PCR反应管中分装45μL，盖上古盖后转移到加样区，避光放于4℃冰箱备用（分装好的PCR反应管需注意区分SA-PCR反应管和mecA-PCR反应管）。
- 将提取固形物及阳性对照、阴性对照、内参照转移到样品处理区，放于4℃冰箱中备用。

二、样本处理（样本处理区）

- 取痰液样本200μL至1.5mL离心管加入4倍体积的1×清洗液A，摇匀，室温放置15-30 min待液化；
- 将液化后的标本，13000 r/min离心5 min；
- 去上清，沉淀加清洗液B 1mL混匀，13000 r/min离心5min；
- 重复样本处理第三步一次；
- 去上清，沉淀中加入100μL清洗液B备用。

三、DNA提取（样本处理区）

- 待测样本制备：向上述处理好的各样本管中分别加入1管提取固形物（轻弹管底尽量将固形物倒净），用强力震荡器（如美国Vortex-Genie）高速涡旋震荡5min，瞬时离心，加入20μL内参照。
- 阴性对照样本制备：取出阴性对照，8000 r/min离心数秒，吸取100μL至1.5mL灭菌离心管中，加入20μL内参照。
- 阳性对照样本制备：（同阴性对照）
- 将待测样本、阳性对照样本和阴性对照样本瞬时离心后95℃干浴2min，即刻冰浴2-5min后13000 r/min离心1min；上清液用于PCR扩增。

四、PCR反应

- 加样（样品处理区或者加样区）
向准备好的PCR反应液管中分别加入5μL上清液（注意避免吸入固形提取物）待测样品，阴性对照样品，阳性对照样品，盖紧管盖后瞬时低速离心（注意PCR反应管管壁上不可沾有反应液，不可有气泡）。
- PCR扩增（检测区）
将准备好的PCR反应管放置于PCR仪上，编辑样本信息并按下列循环参数进行扩增反应：

循环参数：	Stage 1	37℃----2min:	10 循环	SA 检测荧光素：FAM mecA 检测荧光素：HEX 内参照荧光素：Texas Red 反应体积：50μl 荧光信号收集：Stage 4: 55℃----45sec
	Stage 2	94℃----2min:		
	Stage 3	94℃----15sec		
		55℃----45sec		
	Stage 4	94℃----15sec		
		55℃----45sec		
			30 循环	

SA-PCR反应体系包括：SA检测和内参照；mecA-PCR反应体系包括：mecA检测和内参照。

【阳性判断值】

利用仪器配套软件进行自动分析，得到各样品Ct值

1	金葡（SA-FAM）或耐甲氧西林（mecA-HEX） Ct 值≤23，且有较好的对数增长曲线	金葡或耐甲氧西林阳性结果
2	金葡（SA-FAM）或耐甲氧西林（mecA-HEX） Ct 值=30，或“No Ct”（Mx3000P）或者 “Undet.”（ABI 7500），内参（Texas Red） Ct 值<30，且有较好的对数增长曲线	金葡或耐甲氧西林阴性结果（低于检测下限）
3	23< Ct 值<30	灰区， 应重复检测2次

【检验结果的解释】

1. 结果分析条件设定

- 1.1 ABI 7500 基线（baseline）设定：取2个到样品阈值（threshold）前3个循环值作为基线。阈值（threshold）设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线，即Ct_{阴性对照}=30 或者“Undet.”为准。
- 1.2 STRATAGENE Mx3000P 基线设定：选择“适合基线（Adaptive baseline）”设定时的荧光信号。阈值（threshold）设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，即Ct_{阴性对照}=30或者“No Ct”为准。

2. 质控标准

本试剂盒阴、阳性对照应同时满足以下条件，否则视为本次实验无效：

- 2.1 阴性质控：SA-PCR体系中：金葡（SA-FAM）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500），内参（Texas Red）Ct值<30，且有较好的对数增长曲线。mecA-PCR体系中：耐甲氧西林（mecA-HEX）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500），内参（Texas Red）Ct值<30，且有较好的对数增长曲线。
- 2.2 阳性质控：SA-PCR体系中：金葡（SA-FAM）Ct值≤23，且有较好的对数增长曲线；内参（Texas Red）Ct值≤30。mecA-PCR体系中：耐甲氧西林（mecA-HEX）Ct值≤23，且有较好的对数增长曲线；内参（Texas Red）Ct值≤30。

3. 结果判定

3.1 金黄色葡萄球菌结果（SA-PCR体系）判读：

- 3.1.1 金黄色葡萄球菌阴性：金葡（SA-FAM）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500）；且内参（Texas Red）通道Ct值<30，且有较好的对数增长曲线。
- 3.1.2 金黄色葡萄球菌阳性：金葡（SA-FAM）Ct值≤23，且有较好的对数增长曲线；内参（Texas Red）Ct 值≤30。
- 3.1.3 反应无效：金葡（SA-FAM）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500）；且内参（Texas Red）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500）。

3.2 金黄色葡萄球菌耐甲氧西林耐药性（mecA-PCR体系）判读：（在金黄色葡萄球菌结果判读为阳性时做以下判读）

- 3.2.1 甲氧西林敏感：耐甲氧西林（mecA-HEX）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500）；内参（Texas Red）Ct值<30，且有较好的对数增长曲线。
- 3.2.2 甲氧西林耐药：耐甲氧西林（mecA-HEX）Ct值≤23，且有较好的对数增长曲线；内参（Texas Red）Ct值≤30。
- 3.2.3 反应无效：耐甲氧西林（mecA-HEX）Ct值=30或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500）；且内参（Texas Red）Ct值=30 或“No Ct”（Mx3000P）或者“Undet.”（ABI 7500）。

【检验方法的局限性】

本试剂盒适用于检验临床标本，其检测结果也受检测仪器及仪器正确使用的影响。本试剂盒检测结果可供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【产品性能指标】

本试剂盒检测下限为 1.0×10^3 copies/mL，检测范围： 1.0×10^8 copies/mL- 1.0×10^3 copies/mL。

本产品经实验证明不会与临床常见其他各类病原体（表皮葡萄球菌、粪肠球菌、肺炎链球菌、藤黄微球菌、微球菌、蜡芽芽胞杆菌、酿脓链球菌、大肠杆菌、牛链球菌、绿脓杆菌、光滑假丝酵母、热带假丝酵母、肺炎克雷伯菌、肠炎沙门氏菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、腐生葡萄球菌、白色葡萄球菌、柠檬色葡萄球菌、酿脓葡萄球菌）产生交叉反应。

本产品批内差及批间差CV值均小于10%。

在对金黄色葡萄球菌的临床标本检测中，本产品与乳胶凝集试验符合率以及在对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的检测中，本产品与药敏纸片检测结果符合率均达到95%以上，符合临床使用要求。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 请在实验前详细阅读说明书，实验需由有经验或经过培训的人员进行操作。
3. 取用PCR反应管需戴无粉乳胶手套或薄膜手套。
4. PCR反应液内有酶及荧光探针，应避免反复冻融且需避光保存。
5. 试剂盒内各试剂使用前，需充分融化后进行瞬时离心，以使管壁上液体离心到管底。
6. 实验过程中使用的离心管和移液器吸头需进行高温高压灭菌。
7. 临床样本的处理需要在生物安全柜中进行。
8. PCR反应管经瞬时离心后，上机前避免振摇。
9. 吸取模板时，应避免吸到提取固形物。
10. 完成加样后建议用石蜡进行封盖并尽快盖紧管盖。
11. 扩增完毕后，待PCR扩增仪中温度降至室温后再将PCR反应管取出，并装入密闭的塑料袋中，按医疗废弃物处理。
12. 实验中使用的吸头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废液缸内，并与其他废弃物一同灭菌消毒。
13. 每次实验前，生物安全柜需进行紫外灯消毒。实验完成后，生物安全柜和移液器均需用10%的84消毒液擦拭，10分钟后再用75%的乙醇擦拭。
14. 请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

温冬青，赵锦荣，白玉杰，徐修礼，张庆华，阎小君（第四军医大学药理学基因诊断技术应用研究所，陕西西安，新型TaqMan—MGB探针法检测耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 中华医院感染学杂志 2006年 第16卷第6期）
李兴禄，张莉萍，黄长武，陈维贤，聂红，彭辉（重庆医科大学第二临床学院，重庆）耐甲氧西林金黄色葡萄球菌MecA基因快速检测方法的评价 中华医院感染学杂志2003年第13卷第2期
Grisold A J, E Leitner, G Muhlbauer, et al. Detection of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and real-time PCR. J Clin Microbiol, 2002, 40: 2392-2397.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：泰普生物科学（中国）有限公司

住所：厦门市同安区西洲路2043号11层

联系方式：0592-3737666 网址：www.tibchina.com

售后服务单位：泰普生物科学（中国）有限公司

联系方式：0592-3737666 网址：www.tibchina.com

生产地址：厦门市同安区西洲路2041号101、201、301单元；2045号101、201、401、501单元

生产许可证编号：闽药监械生产许20110184号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20153400271

【说明书批准及修改日期】2015年02月11日批准；2017年10月27日修改；2018年03月19日修改；2020年03月18日修改；2022年06月06日修改；2022年11月01日修改；2023年06月02日修改。