

耐甲氧西林金黄色葡萄球菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：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】25 人份 / 盒、50 人份 / 盒、100 人份 / 盒。

【预期用途】本试剂盒用于痰液中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）的特异性核酸片段的定性检测。

可用于临床对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌感染的辅助诊断。滥用抗生素使耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）感染率逐年上升，以肺部感染为主，已成为肺部院内感染的主要致病菌，呈现高度耐药和多重耐药，除糖肽类抗生素外，对其他抗生素广泛耐药。

【检验原理】本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*）的特异性核酸片段进行荧光检测。TaqMan 探针的 5' 末端标记荧光基团，3' 末端标记淬灭基团，完整的探针因荧光基团和淬灭基团距离很近而使发射的荧光被淬灭。在 PCR 反应过程中，Taq 酶具有 5'→3' 核酸外切酶活性，因此同扩增模板结合的 TaqMan 探针会被 Taq 酶降解，从而使得荧光基团和淬灭基团分离，发出荧光信号。基于上述原理，使用荧光定量 PCR 仪实时检测荧光信号，根据荧光信号与扩增循环数之间的关系可得到实时扩增曲线。

【主要组成成分】

序号	组分（见注 1）	包装规格		
		25 人份	50 人份	100 人份
1	核酸抽提液	1.4mL×2	1.4mL×4	1.4mL×8
2	耐甲氧西林金葡菌核酸荧光 PCR 检测混合液	972μL×1	936μL×2	1400μL×3
3	酶（Taq+UNG）	10.8μL×1	20.8μL×1	58μL×1
4	耐甲氧西林金葡菌阴性对照品	400μL×1	600μL×1	1000μL×1
5	耐甲氧西林金葡菌阳性对照品	400μL×1	600μL×1	1000μL×1
6	耐甲氧西林金葡菌内标	30μL×1	60μL×1	110μL×1

注 1：不同批号的组分不可以互换使用。酶在使用前应低速离心数秒，以收集管壁或管盖残留成份。其它组分使用前应在室温下融解，充分混匀、离心数秒后使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒应在 -20±5℃ 避光保存，有效期 12 个月。

试剂盒反复冻融不宜超过 3 次，开瓶后请于 2 个月内使用，生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI Prism 7500、Bio-Rad CFX96、SLAN 荧光 PCR 检测系统。

【样本要求】

痰液：用无菌采样管取受检者肺深部咳出痰液 1~3 毫升，密闭送检，样本可立即用于测试。

上述样本在 2℃~8℃ 保存 7 天；长期保存应置于 ≤-20℃ 条件下，避免反复冻融。

样本采用冰盒或泡沫盒加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. PCR 前处理

A. 手工法

(1) 样本、对照品的核酸裂解处理

冻存样本请在室温融解，充分混匀后使用。

① 试剂盒自带提取试剂

提取工作液配制：取 N×100μL 核酸抽提液与 N×1μL MRSA 内标混匀，N=样本数+对照品数量。

a. 痰液：取痰液加入 4 倍体积的 4%NaOH（自备），摇匀，室温下放置 30 分钟液化，取 0.5mL 液化后样本至 1.5mL 离心管中，再加入 0.5mL 4%NaOH 室温放置 10 分钟后 13000rpm 离心 5 分钟，弃上清。沉淀加无菌生理盐水 1mL 混

匀，13000rpm离心5分钟，弃上清，重复一次，沉淀加入100μL提取工作液充分混匀，99℃干浴或水浴10分钟（误差不得超过1分钟），13000rpm离心5分钟，取上清4μL作为PCR反应模板。

- b. **对照品：**取MRSA阳性对照品、阴性对照品各100μL，分别加入100μL提取工作液后充分混匀，99℃干浴或水浴10分钟，13000rpm离心10分钟，取上清4μL作为PCR反应模板。

② 其他商品化提取试剂

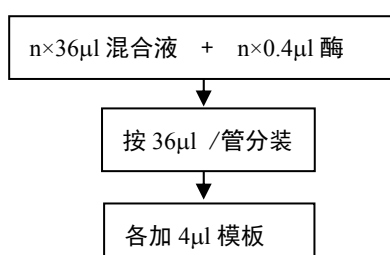
核酸提取也可使用商品化提取试剂盒，推荐使用经验证的试剂：上海之江—核酸提取试剂（备案号为：沪浦械备 20170108）。注意提取时将 MRSA 内标 1μL 加入到裂解工作液中，后续操作按照说明书进行。

(2) 试剂配制

取 $n \times 36\mu\text{L}$ MRSA核酸荧光PCR检测混合液与 $n \times 0.4\mu\text{L}$ 酶（Taq+UNG）（n为反应管数+对照品数），振荡混匀数秒，3000rpm离心数秒。

(3) 加样

取上述混合液36μL置于PCR管中，然后将阴性对照品、样本和阳性对照品的核酸提取产物加入PCR管中，盖好管盖，立即进行PCR扩增反应。



B. 自动化法

该试剂盒除手工提取加样外，也可配合上海之江-全自动核酸检测前处理系统（注册证号：沪械注准20172410039）使用。具体操作方法按照生产厂商的说明书操作步骤进行。

2. PCR 扩增

反应管置于荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

1	37℃×2min	循环 1 次
2	94℃×2min	循环 1 次
3	93℃×15sec	循环 40 次，单点荧光检测在 60℃
	60℃×60sec	

反应体系为40μL，荧光通道检测选择如下表：

通道 机型	A	B	C
ABI7500（见注 2）	FAM	VIC	TEXAS RED
CFX96	FAM	VIC	Cal Red 610
SLAN	通道 1	通道 2	通道 3

注2：如使用ABI Prism7500 实时荧光PCR仪，请务必于passive reference 和 quencher处均选择“none”。

3. 基线和阈值设定

基线一般情况下设定在 6-15 个循环，具体可根据实际情况调整。基线调整原则：选择指数扩增前荧光信号较稳定的区域，起点（Start）避开荧光采集起始阶段的信号波动，终点（End）比最早出现指数扩增的样本 Ct 值减少 1-2 个循环。阈值设定原则为阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

4. 质量控制

	通道	正常结果（Ct/Cq 值）	异常结果	
			Ct/Cq 值	解释及建议
阴性对照品	A	>35 或无数值	≤35	PCR 检测体系受到污染； 建议清洁后重新提取检测

	B	>35 或无数值	≤35	PCR 检测体系受到污染； 建议清洁后重新提取检测
	C	≤35	Ct>35 或无数值	提取或加样异常； 建议重新提取检测
阳性对照品	A	≤32 且具有 S 型扩增曲线	Ct>32 或无数值	提取/加样或试剂异常； 建议重新提取或更换试剂
	B	≤32 且具有 S 型扩增曲线	Ct>32 或无数值	提取/加样或试剂异常； 建议重新提取或更换试剂

5. 试验结果的判断

在质控品正常的情况下，结果判断如下：

MRSA 核酸荧光 PCR 检测混合液 （Ct/Cq 值）				结果判断
通道 A	通道 B	通道 C		
1	≤35 且具有 S 型扩 增曲线	≤35 且具有 S 型扩增 曲线	—— (见注 3)	报告为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA） 阳性
2	>35 或无数值	≤35 且具有 S 型扩增 曲线	—— (见注 3)	报告为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA） 阴性
3	≤35 且具有 S 型扩 增曲线	>35 或无数值	—— (见注 3)	
4	>35	>35	≤35 且具有 S 型扩增曲 线	复检后如与之前情况相同，则判断为耐甲氧西林 金黄色葡萄球菌（MRSA）阴性
5	>35 或无数值	>35 或无数值	>35 或无数值	提取异常或 PCR 反应受到抑制, 建议重新提取检测

注 3: 对于 A 或者 B 通道具有明显 S 型扩增曲线 (Ct≤35) 的样本，其 C 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线 (Ct≤35)，也可能因为高浓度的目的基因竞争性抑制而导致无 S 型扩增曲线或无数值。

【阳性判断值】 根据临床样本检测结果绘制 ROC 曲线，确定本试剂盒的参考值（阳性判断值）为 Ct=35。

【检验结果的解释】 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测时可能会发生假阴性的结果；不合理的样本采集、转运及处理有可能会发生假阴性结果。实验室环境污染，试剂污染，样品交叉污染会出现假阳性结果；试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，出现假阴性的结果。

【检验方法的局限性】 当检测样本中被检核酸含量低于最低检出限 5000 copies/mL 时可能会发生假阴性的结果。

【产品性能指标】

- 最低检测限：5000 copies/mL。
- 分析特异性：本试剂盒与白色念珠菌、肺炎衣原体、淋病奈瑟菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、单纯疱疹病毒 I 型和 II 型、腺病毒、百日咳、解脲支原体、鼻病毒、流感病毒、大肠杆菌、流感嗜血杆菌均不会发生交叉。
- 精密度：用 MRSA 精密度检测品 P1（浓度为 1.25×10^6 copies/mL）、P2（浓度为 1.5×10^4 copies/mL）、P0（阴性样本）进行检测，检测结果 Ct 值的变异系数 (CV, %) 均 < 5.00% (n=10)。
- 抗干扰：浓度为 5mg/mL 的粘蛋白、150mg/L 的万古霉素、150mg/L 的去甲万古霉素、300mg/L 的替考拉宁、50mg/L

的利奈唑胺和 5% 的血液对产品检测均无影响。

5. 阴性参考品符合率：企业阴性参考品 N1~N5 检测结果均为阴性，符合率 5/5。

6. 阳性参考品符合率：企业阳性参考品 P1~P5 检测结果均为阳性，符合率 5/5。

7. 最低检出限参考品符合率：对企业最低检出限参考品 MRSA-S1~S5 进行检测，S1~S4 检测一次，结果均为 MRSA 阳性；S5（浓度为 5×10^3 copies/mL）重复测试 20 次，阳性率 $\geq 85\%$ 。

8. 精密度参考品符合率：对 MRSA 精密度参考品 MRSA-CV1（浓度为 5×10^6 copies/mL）、MRSA-CV2（浓度为 5×10^4 copies/mL）进行检测，通道 A（MecA 基因）和通道 B（金黄色葡萄球菌）检测结果 Ct 值的变异系数（CV,%）均 $\leq 5.00\%$ （n=10）。

9. 临床试验：共检测痰液样本 601 例，以细菌培养法作为参比方法，培养阳性 228 例，培养阴性 373 例，阳性符合率 100%、阴性符合率 100%、总符合率 100%。

【注意事项】

开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

1. 整个检测过程应严格分在三区进行：PCR 反应体系的配制区；样本处理、加样区；PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即清洁工作台，并进行消毒。

2. 使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。

3. 试剂准备和样本处理应使用超净工作台（负压式）或防污染罩，以防止对环境污染。

4. 每次实验应设置阴、阳性对照品。

5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。

6. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸或 75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。

7. 实验中接触过标准品和对照品的废弃物品（如吸头）、扩增完毕的离心管、样本等应进行无害化处理后方可丢弃。

8. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。

9. PCR 反应混合液应避光保存。

10. 反应管中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧，反应结束后严禁打开 PCR 反应管。

11. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

[1] 陆亚华,时庭文,陈虹等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药性及耐药基因研究. 中华检验医学杂志, 2005(28)7: 744-745.

[2] 余方友,李美兰,林晓梅等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的SCCmec 基因型及耐药谱研究. 中华微生物学和免疫学杂志, 2006(26)6: 543-543.

[3] 胡志东,李金,马睿等. 耐甲氧西林金黄色葡萄球菌耐药基因及耐消毒剂基因的研究. 中华医院感染学杂志,2006(16)5: 481-484.

[4] S. J. van Hal, et al. Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus (MRSA) Detection: Comparison of Two Molecular Methods (IDI-MRSA PCR Assay and GenoType MRSA Direct PCR Assay) with Three Selective MRSA Agars (MRSA ID, MRSASelect, and CHROMagar MRSA) for Use with Infection-Control Swabs J. Clin. Microbiol., Aug 2007; 45: 2486 - 2490.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海之江生物科技股份有限公司

住所：上海市张江高科技产业东区瑞庆路 528 号 20 幢乙号 1 层、21 幢甲号 1 层

联系方式：021-34680028 E-mail: river@liferiver.com.cn

售后服务单位名称：上海之江生物科技股份有限公司

联系方式：021-34680028 E-mail: service@liferiver.com.cn

生产地址 1：上海市浦东新区张江高科技产业东区瑞庆路 528 号 20 幢乙号 1 层、21 幢甲号 1 层

生产地址 2：上海市闵行区新骏环路 588 号 26 幢

医疗器械生产企业许可证编号：沪食药监械生产许 20081591 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20193400153

【说明书核准日期及修改日期】 2019-4-1