

【产品名称】
通用名称：呼吸道病原菌核酸检测试剂盒（恒温扩增芯片法）

【包装规格】
12 人份/盒

【预期用途】
本试剂盒用于体外定性检测人痰液提取核酸中 8 种临床常见下呼吸道感染病原菌（肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、流感嗜血杆菌）。

下呼吸道感染仍是我国临床上最常见的疾病之一，其中绝大多数为细菌性下呼吸道感染。世界卫生组织 2013 年发布的统计结果显示，世界十大死因中下呼吸道感染（5.9%）位列第三位（前两位为冠心病和中风），位列第四位的慢性阻塞性肺病（5.4%）死亡也多和感染相关。临床常规的生化指标分析方法对患者所感染的病原菌种属做出准确鉴定，大多数临床治疗仍处于经验抗菌素应用阶段，在使用高级抗生素方面存在较大的盲目性。目前临床上主要使用的鉴定病原菌的方法主要是依靠细菌培养法等，用于常见的下呼吸道感染疾病的辅助诊断。

【检验原理】
本试剂盒采用恒温扩增技术，在微流控碟式芯片上进行反应，利用荧光染料掺入法在恒温扩增微流控芯片核酸分析仪上进行恒温（65℃）反应和实时荧光分析，在具有链置换功能的聚合酶作用下，扩增阳性的样本会产生类似“S”形扩增曲线，一步完成对靶基因的扩增和检测。

本试剂盒采用的恒温扩增技术是环介导恒温扩增法（Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP），其原理是基于 DNA 在 65℃ 左右处于动态平衡状态，任何一个引物向双链 DNA 的互补部位进行碱基配对延伸时，另一条链就会解离，变成单链。针对靶序列的 6 个区域设计 4 条特异引物（包括 2 条内引物和 2 条外引物），利用具备链置换功能的 DNA 聚合酶在恒定温度下不断复制扩增 DNA，其反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长和再循环阶段，最终形成茎环结构和多环花椰菜样结构的 DNA 片段混合物。通常为了提高反应效率，还在反应体系中添加两条环引物，使之分别与茎环结构结合，启动链置换合成，循环复制。

每张碟式芯片上设有 24 个反应池（结构详见图 1，反应池逆时针依次编号，其中进出样口 1 对应的为 1 号反应池），可在特定的反应池包埋固定一套引物用于一种核酸靶序列的扩增与检测。将样本 DNA 与扩增试剂混合后注入芯片，并通过离心分配至各个反应池，在芯片的各个反应池中同时进行独立的恒温扩增反应并进行实时荧光检测，若检测到某反应池出现“S”形扩增曲线，则该反应池对应的检测指标为阳性。

每个反应池对应的检测指标信息详见表 1。

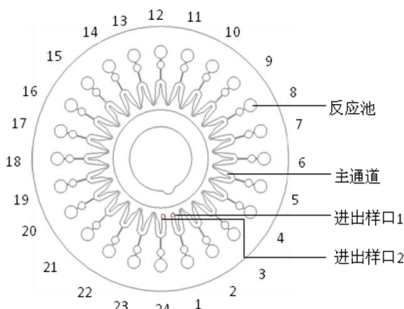


图 1 碟式芯片结构图

表 1 芯片反应池对应检测指标

反应池	检测指标名称	反应池	检测指标名称
1	阴性对照	13	阴性对照
2	肺炎链球菌	14	嗜麦芽窄食单胞菌
3	金黄色葡萄球菌	15	流感嗜血杆菌
4	阴性对照	16	阴性对照
5	耐甲氧西林葡萄球菌	17	-
6	大肠埃希氏菌（阳性对照）	18	-
7	阴性对照	19	阴性对照
8	肺炎克雷伯菌	20	-

9	铜绿假单胞菌	21	-
10	阴性对照	22	阴性对照
11	鲍曼不动杆菌	23	阳性外对照
12	阳性内对照	24	阴性对照

提示：请勿直接碰触芯片反应池及进出样口区域！

【主要组成成分】

表 2 试剂盒组成

组分名称	主要组分	数量
芯片	引物	12 片
封口膜	/	1 张
恒温扩增试剂	荧光染料、酶	270μL/管
阳性对照品	大肠埃希氏菌基因组 DNA	160μL/管

注：不同批号试剂盒中各组分不可以混用。阴性对照品为纯化水，请用户自备。

【储存条件及有效期】

试剂盒在-20℃±5℃避光保存，有效期 8 个月。

芯片为独立包装，需平衡到室温后再打开包装。

试剂盒在使用时应尽量减少试剂冻融次数，建议冻融次数不超过 3 次。

生产日期和失效日期见产品标签。

【适用仪器】

适用于成都博奥晶芯生物科技有限公司生产的 RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪和 RTisochip-W 恒温扩增核酸分析仪。

【样本要求】

1. 样本类型

痰液提取核酸。

2. 样本收集

样本来源于门诊病例或住院病例。采集疑似下呼吸道感染患者的痰液，要求白细胞数大于 25/低倍视野且上皮细胞<10/低倍视野为合格痰样本，样本量应不少于 0.6 mL，置于样本收集管内。

3. 样本提取

核酸提取建议采取本公司生产的核酸提取试剂（产品货号 360090）进行，该产品采用玻璃珠的机械力，破碎裂解细菌，释放核酸至核酸提取液中，从而达到提取核酸的目的。提取的核酸应澄清透明。

4. 样本保存

提取的核酸应立即检测，若不能立即检测，-20℃保存不应超过 2 个月并避免反复冻融。

5. 样本运输

样本的短期运输应采用冰壶、泡沫箱加冰或干冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 实验前准备

根据实验需求，准备相应数量的试剂盒。

提示：1. 以下实验操作均要求在洁净工作台内进行，开始前先将洁净工作台用 75%乙醇擦拭干净，再紫外灭菌 15 分钟。
2. 灭菌时切勿将芯片置于紫外光照射范围内，以免破坏引物结构。

2. 仪器和材料要求

➤ RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪或 RTisochip-W 恒温扩增核酸分析仪

➤ 低速离心机（规格：可离心恒温扩增芯片）

➤ 微量移液器（规格：10~100 μL）

➤ 移液器吸头（要求洁净无菌进口黄色吸头，规格：20~200 μL）

➤ 离心管（要求洁净无菌，规格：200 μL）

➤ 各种规格的离心管架

3. 芯片加样

3.1 配制恒温扩增反应体系

从试剂盒中取出恒温扩增试剂使其充分融化（室温解冻），轻摇充分混匀后瞬时离心至管底。



在试剂储存和准备区，吸取 20 μ L 恒温扩增试剂加入准备好的 200 μ L 离心管中，盖好管盖后移至标本制备区，每份样品限 1 个离心管。

在标本制备区，加入 34.5 μ L 被检核酸样品（或者对照品），轻摇使其充分混合均匀，瞬时离心至管底。每份核酸扩增反应体系总体积为 54.5 μ L（表 3）。

表 3 恒温扩增反应体系

反应物	体积(μ L)
恒温扩增试剂	20.0
模板 DNA	34.5
共计	54.5

3.2 芯片加样

在标本制备区，从试剂盒中取出芯片使其恢复至室温，在洁净工作台上打开包装并将芯片进出样口向上，用移液器吸取 50 μ L 上述配制好的核酸扩增反应体系，从进出样口 1 加入到芯片主通道中，待其充满芯片主通道即停止加样。取 1 张封口膜，覆盖于进出样口上，再取 1 支洁净吸头，向 1 个方向按压封口膜至贴合紧密。

提示：1. 进出样口较小，加样前请确认已将吸头牢固插入进出样口以免漏液。
2. 在使用外物按压封口膜时，避免用力过大，造成胶膜破坏，影响密封效果；贴封口膜时注意不要盖住反应池。

3.3 芯片离心

将加样后的芯片固定在低速离心机上，以 6000rpm 离心 30 秒后取下。

提示：离心时需确认芯片固定牢靠，建议进出口一侧在下方。

4. 核酸扩增及结果判读

4.1 核酸扩增

4.1.1 打开 RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪或 RTisochip-W 恒温扩增核酸分析仪及其配套软件，点击“打开光源”按钮，预热 10 分钟。

4.1.2 点击“出仓”按钮，将芯片盖片向上平稳放置在托盘上，托盘中心定位装置与芯片中心大圆孔对齐，托盘定位小圆柱从芯片中心缺口处穿出以固定芯片。点击“入仓”按钮，将芯片送入核酸分析仪中。

4.1.3 在检测界面的“样品信息”区域录入待检样本的信息，其中样品编号、芯片编号和样本类型为必填项，其它为选填项。样本信息录入后，可点击操作区域的“开始检测”按钮开始样本检测，仪器将按照预设参数（见表 4）进行样本检测，在“荧光曲线区域”显示实时荧光曲线，在“状态栏”左侧显示实时监控的温度值，并在“检测状态信息”区域显示剩余时间。检测完成后，软件将自动进行数据分析，同时仪器将自动进行降温处理，待降温到 37℃ 后样本仓将自动出仓，将芯片取出。相关操作可参考《RTisochip™-A 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪说明书》或《RTisochip-W 恒温扩增核酸分析仪说明书》。

表 4 核酸扩增反应参数

步骤	1	2
温度（℃）	37	65
时间（min）	3	47

4.2 结果判读

检测完成后软件将采用最大二阶导数法结合其他算法计算出“S 型”扩增曲线进入快速扩增期的第一个拐点，拐点对应的时刻与原点时刻的差值定义为 T_p 值，根据 T_p 值并结合阳性判断值进行结果判读。“荧光曲线区域”显示归一化曲线，“检测结果”区域显示质控结果和各检测指标的检测结果。

【阳性判断值】

本试剂盒采用 ROC 法计算得到 8 种待检指标的阳性判断值。当检测指标的 T_p 值小于或等于该指标的阳性判断值时，判读为阳性；当检测指标的 T_p 值大于该指标的阳性判断值时，判读为阴性。各指标的阳性判断值如下：

指标名称	阳性判断值
肺炎链球菌	30
金黄色葡萄球菌	34
耐甲氧西林葡萄球菌	22

肺炎克雷伯菌	29
铜绿假单胞菌	36
鲍曼不动杆菌	36
嗜麦芽窄食单胞菌	27
流感嗜血杆菌	36

【检验结果的解释】

1）芯片内阳性质控和阴性质控

本试剂盒的每张芯片内均设有 1 个阳性质控（即：表 1 中的阳性外对照）和 9 个阴性质控（即：表 1 中的阴性对照）。根据结果判读标准，阳性质控检测结果应为阳性，同时 9 个阴性质控结果均为阴性。图 2 为正常扩增结果图，图像右侧为结果显示区域，“质控结果：实验正常（阳性正常，阴性正常）”，表明本次检验结果有效。若任一结果错误，则判定本次样品检测结果无效，需要进行复检。

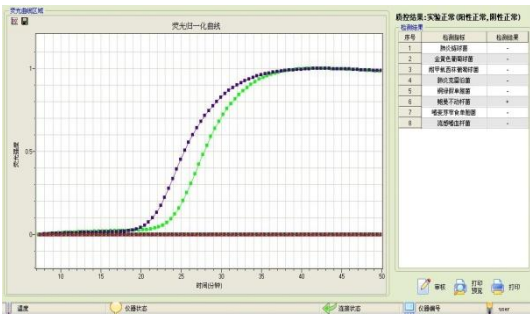


图 2 正常扩增结果图

图 3 为异常扩增结果图。“质控结果：实验异常（阳性异常，阴性正常）”，判定本次样品检验结果无效，需要进行复检。若复检后，质控结果仍为“实验异常（阳性异常，阴性正常）”，需重新采集样本进行检测。

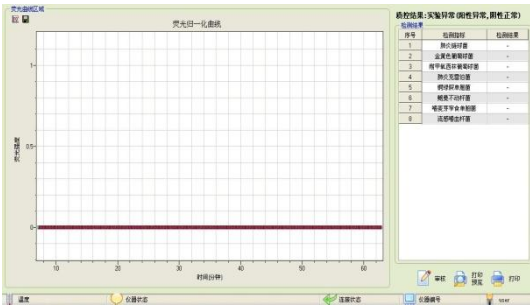


图 3 异常扩增结果图

芯片内还设有 1 个阳性内对照，为人的特异引物。临床样品检测时，其结果应为阳性；若样品中人基因组 DNA 含量较少时，该结果可能为阴性，说明样品中人的细胞数较少，需要重新采集样本进行检测。

2）试剂盒对照品

阳性对照品：大肠埃希氏菌（阳性对照，Eco）曲线应为阳性（ T_p 值小于或等于 30），其它细菌均为阴性。

首次操作试剂盒时，应使用阴性对照品及阳性对照品进行检测：阴性对照品检测结果为阴性；阳性对照品检测结果为大肠埃希氏菌阳性。以质控实验环境和人员操作。

当对操作环境洁净度存疑时，可使用阴性对照品及阳性对照品进行质控。

3）结果判读说明

对于有效检测结果，如图 2，界面右侧列表中检测结果“+”表明样品检测到该细菌，检测结果“-”表明样品未检测到该细菌；图像左侧显示归一化荧光曲线，其中扩增曲线呈“S”型的为阳性指标，呈水平直线的为阴性指标。

本试剂盒最低检测限为 5×10^2 拷贝/反应，检测结果为某指标阳性表示样品中含有高于最低检测限的该细菌核酸。检验样本的结果必须结合其他指标综合判断，不能作为临床诊断的唯一指标，阳性结果不能排除污染和定植病原体，阴性结果不能排除低拷贝的致病菌。



其中，关于葡萄球菌两个检测指标的结果解释如下表 5：

表 5 葡萄球菌结果解释

耐甲氧西林葡萄球菌（MRS）			
		“+”	“-”
金黄色葡萄球菌	“+”	耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（MRSA）*	甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（MSSA）
	“-”	非 MRSA 的耐甲氧西林葡萄球菌（MRCNS 等）*	未检测到金黄色葡萄球菌；未检测到耐甲氧西林葡萄球菌。

*注：本产品耐甲氧西林葡萄球菌指标由 *mecA* 基因指示，该耐药基因理论上不能排除为其他菌所携带。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于痰液提取的核酸检测。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。
2. 本试剂盒检测对象为常见下呼吸道病原菌，共计 8 种，并未涵盖与下呼吸道感染相关的全部细菌，且不含与下呼吸道感染相关的病毒及真菌。因此，报告的呼吸道病原菌菌种仅限于本试剂盒所检测的菌种，检测结果阴性不代表样本未含有其它病原体。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒中检测的耐甲氧西林葡萄球菌经过耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、耐甲氧西林溶血葡萄球菌、耐甲氧西林人葡萄球菌、耐甲氧西林路邓葡萄球菌验证，理论上不排除其它耐甲氧西林葡萄球菌。
2. 准确性：该试剂盒对指标涵盖的 8 种（19 株）呼吸道病原菌检测结果均正确。
3. 特异性：该试剂盒指标涵盖的 8 种呼吸道病原菌之间无交叉反应；试剂盒对人基因组、56 种临床常见近源菌（酿脓链球菌、停乳链球菌、血链球菌、变异链球菌、戈登链球菌、唾液链球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、中间葡萄球菌、路邓葡萄球菌、施氏葡萄球菌、腐生葡萄球菌、猪葡萄球菌、产酸克雷伯氏菌、黑座克雷伯氏菌、解鸟氨酸克雷伯氏菌、土生克雷伯氏菌、植生克雷伯氏菌、产碱假单胞菌、荧光假单胞菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌、门多萨假单胞菌、耐氏假单胞菌、类产碱假单胞菌、脱氮假单胞菌、琼氏不动杆菌、乙酸钙不动杆菌、溶血不动杆菌、拜氏不动杆菌、鲁氏不动杆菌、嗜氨基酸寡养单胞菌、微嗜酸寡养单胞菌、小麦黄单胞菌、气单胞菌、嗜根寡养单胞菌、副流感嗜血杆菌、副溶血性嗜血杆菌、溶血嗜血杆菌、胸膜肺炎嗜血杆菌、副猪嗜血杆菌、奇异变形杆菌、耻垢分枝杆菌、产气肠杆菌、粪产碱杆菌、藤黄微球菌、白假丝酵母即白色念珠菌、粪肠球菌、黏质沙雷氏菌、普通变形杆菌、尿肠球菌、弗氏枸橼酸杆菌、洛菲不动杆菌、大肠埃希氏菌、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌）、15 份结核分枝杆菌国家阴性参考品（鸟分枝杆菌、土地分枝杆菌、施氏分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、亚洲分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、戈登分枝杆菌、龟裂分枝杆菌、偶然分枝杆菌、草分枝杆菌、巴西诺卡氏菌、北京棒杆菌、肺炎球菌、嗜肺军团菌、百日咳博德特氏菌）进行检测，检测结果与试剂盒检测指标均无交叉反应。
4. 最低检测限：5×10² copies/反应浓度的最低检测限参考品的检测结果分别为相应病原菌阳性且其他病原菌阴性，5×10 copies/反应浓度的最低检测限参考品的检测结果分别为相应病原菌阳性或阴性，且其他病原菌阴性。
5. 重复性：呼吸道病原菌企业重复性参考品的检测结果均为 8 种病原菌阳性，且相应 T_p 值的变异系数（CV）不高于 10%。
6. 抗干扰能力：人痰液对试剂盒检测结果无影响；当待测样本中分别含有 4×10³ 拷贝/μL 以内的人基因组 DNA、30% 以下浓度的人全血、正常给药浓度的阿齐霉素、注射用青霉素钾、左氧氟沙星片、阿莫西林克拉维酸钾片、注射用盐酸万古霉素、注射用盐酸去甲万古霉素、注射用盐酸头孢吡肟、哌拉西林、注射用亚胺培南-西司他丁钠、头孢唑辛酯分散片、米诺环素（盐酸米诺环素胶囊）、复方磺胺甲噁唑（复方磺胺甲噁唑片）、注射用环丙沙星（西普乐注射液）、头孢他啶（复达欣粉针）、奥司他韦（达菲胶囊）、利巴韦林（利巴韦林片）、莫匹罗星软膏、盐酸羟甲唑啉喷雾剂、丙酸倍氯米松鼻喷雾剂、布地

奈德鼻喷雾剂以及其它微生物时，不会对试剂盒检测结果造成明显影响。

7. 临床试验：本试剂盒在五家临床医院进行了共计 2084 例痰样本的临床试验，与测序方法的阳性符合率均大于 96%，阴性符合率均大于 99%，总符合率均大于 99%。其中统计了 733 例临床样本的试剂盒检测结果和培养结果，一致率为 67.4%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。
2. 操作注意安全防护。操作致病菌 DNA 应在规定的实验场所进行，穿戴防护衣物、一次性手套、口罩；所有直接接触过细菌的物品应严格消毒后销毁或再次使用。
3. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检测实验室的管理规范执行。
4. 操作人员必须经过培训，合格后方可上岗。
5. 使用前，液体试剂应混合均匀，尽量避免反复冻融；开封后的恒温扩增试剂一定要避光-20℃±5℃保存。
6. 所使用的接触核酸扩增试剂的材料均要求洁净无菌。
7. 芯片以及封口膜为一次性使用，如果发现芯片开封前铝箔袋包装有破损，请勿使用。
8. 请勿使用过期试剂。
9. 建议至少每周使用质控品检验一次，以对实验室环境和试剂进行质控。
10. 根据《中华人民共和国药典》2015 年版四部，室温系指 10~30℃。

【标识的解释】

标签上“**IVD**”标识代表“体外诊断医疗器械”。

【参考文献】

1. Huang GL, et al. Sensitive sequence-specific molecular identification system comprising an aluminum micro-nanofluidic chip and associated real-time confocal detector. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 695: 1-10.
2. Kang Y, et al. Etiologic diagnosis of lower respiratory tract bacterial infections using sputum samples and quantitative loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e38743 1-12.
3. 黄国亮等.痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究, *光学学报*, 2012, 32(2): 1-8.
4. 陈愉生等.环介导等温扩增技术在下呼吸道感染常见病原体检测中的应用, *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(4): 270-273.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：成都博奥晶芯生物科技有限公司
住所：成都市温江区永宁镇八一路北段 88 号
联系方式：028-67278289
传真：028-67278189
邮编：611135
网址：<http://www.capitalbiotech.com>

售后服务单位名称：北京博奥晶芯生物技术有限公司
联系方式：400-9968-999
邮箱：service@capitalbiotech.com
网址：<http://www.capitalbiotech.com>

生产地址：成都市温江区永宁镇八一路北段 88 号 3 栋-2 三楼、3 栋-3、3 栋-4（一楼 E-109、二楼、顶楼 3-3 至 3-5）、4 栋（101、103）、5 栋
生产许可证编号：川食药监械生产许 20150041 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173401346

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2022 年 09 月 08 日
修改日期：2022 年 09 月 26 日
说明书编号：UML—034
版次：1.3