

嗜肺军团菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：嗜肺军团菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 25 人份 / 盒、50 人份 / 盒。

【预期用途】

本试剂盒用于对人痰液样本中的嗜肺军团菌（Legionella Pneumophila）DNA 进行荧光 PCR 定性检测。

本试剂盒可用于临床对嗜肺军团菌感染的辅助诊断。本试剂盒的实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。嗜肺军团菌(Legionella pneumophila, Lp) 是一种广泛存在于水环境中革兰氏阴性致病菌，可入侵原生动物的巨噬细胞，导致军团病。军团病多发于夏秋季，既可暴发流行也可散发。军团菌感染的主要途径是经呼吸道感染，气溶胶、原虫是军团菌传播的重要载体。年龄较大者、基础免疫较差者、长期在宾馆、医院、大型建筑工地的人员都是军团菌感染的高危人群；空调冷却水、喷泉水、旋流池水、冷热水管道系统等人工水源是军团菌的主要生存场所及传播此病的主要来源。嗜肺军团菌是引起流行性、散发性社区获得性肺炎和医院内获得性肺炎的重要病原菌，其流行致死率高 30%，散发致死率甚至高达 69%。嗜肺军团菌引起的疾病分为军团肺炎(Legionella pneumonia)和庞蒂亚克热 (Pontiac fever) 两类临床表现。军团肺炎属非典型性肺炎范畴，为重型，死亡率 15%~30%，免疫力低下的患者死亡率高达 80%。潜伏期为 2~6 天，症状为高热、呼吸系统症状及全身中毒性表现为特点。常有干咳或少量粘液痰，亦可见血丝、咯血。胸痛、腹泻常见。病人可因休克、呼吸衰竭、肾功能衰竭而死亡。庞蒂亚克热是一种类似流感的非肺炎型军团菌感染，又称流感样型，为症状似感冒，有发冷，发热，头痛，肌肉痛，无肺炎，一般病程 3~5 天自愈，无死亡病例。

【检验原理】 本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，利用特异性引物和荧光标记探针，对嗜肺军团菌的特异性 DNA 核酸片段进行荧光检测。

【主要组成成分】

序号	组分	包装规格		体积 / 人份	主要成分
		25 人份	50 人份		
1	核酸抽提液	1.4mL×2	1.4mL×4	100μL	氯化钠、EDTA-Na ₂
2	嗜肺军团菌核酸荧光 PCR 检测混合液	972μL×1	936μL×2	36μL	1 对引物、1 条荧光探针及 PCR Mix
3	酶（Taq+UNG）	10.8μL×1	20.8μL×1	0.4μL	Taq DNA 聚合酶、UNG 酶
4	嗜肺军团菌阴性对照品	100μL×1	100μL×1		0.9%氯化钠溶液
5	嗜肺军团菌阳性对照品	100μL×1	100μL×1		含目的基因片段的基因工程菌
6	嗜肺军团菌内标	30μL×1	60μL×1	1μL	含目的基因相似片段的基因工程菌

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

【储存条件和有效期】 试剂盒应在-20±5℃避光保存，有效期 12 个月。

采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封进行运输；荧光 PCR 检测混合液反复冻融不宜超过 3 次。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 实时荧光 PCR 仪；Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪；上海宏石 Slan 荧光 PCR 检测系统；Roche LightCycler480。

【标本要求】

痰液：采集痰液样本前，应让受检者刷牙并漱口以除去大部分口腔内杂菌，指导受检者用力咳出气管深部的痰液于无菌痰杯中，痰量不少于 1mL，以晨痰为佳。样本立即密闭送检。

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

【检验方法】

1. 样本、对照品的核酸裂解处理

冻存样本和对照品请在室温融解，充分混匀后使用。

核酸抽提液*配制：取 N×100μL 核酸提取液与 N×1μL 内标混匀，N=样本数。

1) 痰液标本：痰液中加入 4 倍体积的 4%NaOH（自备），摇匀，室温下放置 30 分钟液化（若痰液仍很粘稠可增加放置时间直至痰液液化），取 0.5mL 样品至 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。沉淀加无菌生理盐水 1mL 打匀，13000rpm 离心 5 分钟；再重复洗涤一次。去尽上清，沉淀直接加入 100μl 核酸提取液*，振荡 10 秒，99℃（干\水浴锅设定温度）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) 对照品：取阳性对照品、阴性对照品各 100μL，分别加入 100μL 核酸提取液*后充分混匀，99℃干浴或水浴 10 分钟，然后 13000rpm 离心 10 分钟，取上清 4μL 作为 PCR 反应模板。

2. 试剂配制

取 n×36μL 嗜肺军团菌核酸荧光 PCR 检测混合液与 n×0.4μL 酶（Taq+UNG）(n 为反应管数)，振荡混匀数秒，3000rpm 离心数秒。

3. 加样 取上述混合液 36μL 分别置于 PCR 管中，然后将样本、阳性对照品、阴性对照品处理上清液各 4μL 分别加入 PCR 管中，盖好管盖，立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增 反应管置于定量荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

37℃×2min; 94℃×2min; 再按 93℃×15sec→60℃×60sec，循环 40 次; 单点荧光检测在 60℃。反应体系为 40μL。

荧光通道检测选择如下表：

机型\通道	1	2
ABI7500	FAM	VIC
CFX96	FAM	VIC
SLAN	通道 1	通道 2

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

5. 基线和阈值设定 基线调整取 6-15 个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

6. 质量控制 阴性对照品检测结果应为：FAM 通道 Ct 栏显示 Undetermined（ABI7500）或 N/A（CFX96）或 No Ct（SLAN），且 VIC 通道 Ct 值≤38（且有明显 S 型扩增曲线）；阳性对照品检测结果应为：FAM 通道 Ct 值≤35，且有明显 S 型扩增曲线。否则实验视为无效。

7. 试验结果的判断

	通道	Ct 值	结果判断
1	FAM	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	样本低于检测限，报告为嗜肺军团菌阴性
	VIC	≤38，且有明显 S 型扩增曲线	
2	FAM	≤38，且有明显 S 型扩增曲线	报告为嗜肺军团菌阳性
	VIC	——（见注 1）	
3	FAM	38~40	复检一次,如仍为 38~40,则报告为阴性
4	FAM	Undetermined 或 N/A 或 No	PCR 反应受到抑制或提取不当，需要重复试验。
	VIC	Undetermined 或 N/A 或 No	

注 1：对于 FAM 通道具有明显 S 型扩增曲线（Ct≤38）的样本，其 VIC 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线（Ct≤38），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 No Ct。

【阳性判断值】 根据临床试验数据绘制 ROC 曲线，确定本试剂盒的参考值（阳性判断值）为 Ct=38。

【对检验结果的解释】 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，出现假阴性或定量检测不准确的结果。当样本在 FAM 及 VIC 通道均显示为 Undetermined 时，则表明 PCR 反应受到抑制或提取不当，需重复试验。

【检验方法的局限性】 ① 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 阴性结果仅说明样本浓度低于本试剂盒的检出限值但不能完全排除感染的可能，阳性结果建议采用金标准方法进一步确认。③ 有关假阴性结果的可能性分析：当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测限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；未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子可能会导致假阴性结果；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。④ 有关假阳性结果的可能性分析：实验室环境污染，试剂污染，样本交叉污染会出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 最低检测限： $1 \times 10^3 \text{copies/mL}$ ；
2. 分析特异性：经验证本试剂盒与肺炎衣原体、肺炎支原体、流感嗜血杆菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、人副流感病毒、人冠状病毒、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、巨细胞病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、单纯疱疹病毒、肺炎克雷伯菌、呼吸道腺病毒、甲型溶血性链球菌、绿脓杆菌、埃希大肠杆菌、呼吸道合胞病毒均不会发生交叉。
3. 企业阳性参考品：用嗜肺军团菌阳性参考品 P1~P5 进行检测，检测结果应均为嗜肺军团菌阳性（符合率 5/5）。
4. 企业阴性参考品：用嗜肺军团菌阴性参考品 N1~N5 进行检测，检测结果应均为嗜肺军团菌阴性（符合率 5/5）
5. 企业最低检出限参考品：嗜肺军团菌最低检出限参考品 LP-S1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释，检测结果均应为嗜肺军团菌阳性。
6. 精密度：用高、低两个浓度的嗜肺军团菌精密度参考品进行检测（n=10），检测结果 Ct 值的变异系数（CV,%）均<5%。
7. 干扰物质研究：常用药物，如利福平（≤9mg/L）、红霉素（≤7mg/L）、强力霉素（≤0.4mg/L）、头孢噻肟（≤25mg/L）、莫西沙星（≤3.1mg/L）、氧氟沙星（≤3.06mg/L）、阿奇霉素（≤1mg/L）、螺旋霉素（≤1mg/L）、氢化可的松（≤25mg/L）、万古霉素（≤30mg/L）均不会干扰本试剂盒检测。含粘蛋白（≤0.9mg/mL）标本或含 5%血液标本不会干扰本试剂盒检测。
8. 血清型验证：经验证，本产品对 9 种嗜肺军团菌血清型均能检测，且分析灵敏度均能达到 $1 \times 10^3 \text{copies/mL}$ ，精密度<5%；9 种血清型如下：1 型、4 型、5 型、6 型、8 型、9 型、10 型、12 型、14 型。

【注意事项】 本产品仅用于体外诊断，未含人源性材料。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；标本处理、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。实验后即请清洁工作台，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. 试剂准备和标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（如吸头）、扩增完毕的离心管、标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] Deborah A. Wilson, Belinda Yen-Lieberman Detection of Legionella pneumophila by Real-Time PCR for the mip Gene J. Clin. Microbiol., Jul 2003; 41: 3327 - 3330.
[2] N. Roch and M. Maurin Antibiotic susceptibilities of Legionella pneumophila strain Paris in THP-1 cells as determined by real-time PCR assay J. Antimicrob. Chemother., Jun 2005; 55: 866 - 871.
[3] Diaraf Farba Yaradou, Sylvie Hallier-Soulier Integrated Real-Time PCR for Detection and Monitoring of Legionella pneumophila in Water Systems Appl. Envir. Microbiol., Mar 2007; 73: 1452 - 1456.

【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：上海市漕河泾开发区浦江高科技园区新骏环路588号26号楼
医疗器械生产企业许可证编号：沪食药监械生产许20081591号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20183401704

【说明书批准及修改日期】2018-5-12