

百日咳杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名：百日咳杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人鼻咽拭子样本中的百日咳杆菌（*Bordetella pertussis*）核酸。

本产品用于呼吸道感染疑似百日咳杆菌感染患者的辅助诊断，仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。

百日咳杆菌属鲍特菌属（*Bordetella*），革兰阴性菌，能引起严重的急性呼吸道感染，可通过飞沫传播，具有很强的传染性。百日咳杆菌感染的临床特征为典型的阵发性、痉挛性咳嗽，咳嗽终末出现深长的鸡啼样吸气性吼声，病程长达 2~3 个月，故有百日咳之称。实验室的主要诊断方法现在主要有培养法、血清学、荧光 PCR 法等。

【检验原理】

本试剂盒以百日咳杆菌保守序列为靶区域，设计特异性引物和探针，配以 PCR 反应液，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现百日咳杆菌 DNA 的检测。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），通过检测人表皮细胞中的甘油醛-3-磷酸脱氢酶基因（GAPDH）来评定采集的样本是否适用于扩增反应，监测待测样本中是否具有 PCR 抑制物，评价核酸提取的质量，避免 PCR 假阴性。PCR 检测体系含有内参比荧光 ROX，用于校正加样误差和管间差异，便于仪器自动分析报告荧光与内参比荧光 ROX 的比值。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下组分组成：

序号	试剂名称	规格与装量	主要成分
1	百日咳杆菌-PCR 反应液	912μL/管×2 管	引物、探针、dNTPs、MgCl ₂ 溶液、PCR buffer、ROX 溶液
2	百日咳杆菌-酶混合液	96μL/管×1 管	UDG 酶、Taq 酶
3	百日咳杆菌-阳性参照品 A	50μL/管×1 管	含有靶基因和内参基因片段（GAPDH）的质粒
4	百日咳杆菌-阳性参照品 B	50μL/管×1 管	含有靶基因和内参基因片段（GAPDH）的质粒
5	百日咳杆菌-阳性参照品 C	50μL/管×1 管	含有靶基因和内参基因片段（GAPDH）的质粒
6	百日咳杆菌-阳性参照品 D	50μL/管×1 管	含有靶基因和内参基因片段（GAPDH）的质粒
7	百日咳杆菌-阳性对照	50μL/管×1 管	含有靶基因和内参基因片段（GAPDH）的质粒
8	百日咳杆菌-阴性对照	1mL/管×1 管	生理盐水

备注：

- 1) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。
- 2) 试剂盒内的生物样本均已灭活处理。
- 3) 自备试验器材：无 DNA 酶的 1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、吸嘴（建议使用带滤芯吸嘴，规格：10μL、200μL、1000μL）；离心机；振荡混合器；各种规格的加样枪。
- 4) 使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）或样本释放剂（湘长械备 20150022 号）

【储存条件及有效期】

试剂应避光密封保存于 -20±5℃。试剂盒有效期为 12 个月，生产日期，失效日期请见外包装盒。

不使用时，这些试剂在包装标识的有效期内可稳定存放。一旦使用，扩增试剂盒反复冻融应不超过 3 次。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 荧光 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：鼻咽拭子。
2. 样本采集：用无菌拭子以耳垂与鼻尖方向插入鼻孔，轻轻转动拭子并向鼻腔内部推进至鼻咽处，停留数秒后缓慢转动退出，密封送检。
3. 样本保存和运送和接收：经上述处理后的待测样本 48 小时内进行检测的可存放于 4℃，6 个月以内可存放于 -20℃ 以下，6 个月以上应置于 -70℃ 以下。应避免反复冻融。标本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封运输。

【检验方法】

1. ABI 7500 荧光 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪参照以下步骤进行处理：

1.1 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1.1 取出包装盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，混匀并瞬时离心后备用。

1.1.2 根据待测样本、阴性对照、阳性对照、阳性参照品 A~D 的数量，按比例（百日咳杆菌-PCR 反应液 38μL/人份 + 百日咳杆菌-酶混合液 2μL/人份）取相应量的组分，充分混匀成 PCR 混合液，瞬时离心后备用。

1.1.3 将上述准备好的试剂转移至样本处理区，待用。

1.2 样本处理（在样本处理区进行）（百日咳杆菌-阴性对照与待测样本同步处理）

1.2.1 样本前处理

往样本收集管中加入 1mL 无菌生理盐水或细胞保存液（细胞保存液信息见下表），充分振荡混匀，然后把全部液体（样本洗脱液）倒入 1.5mL 离心管中（拭子靠离心管壁挤干后丢弃），作为待测样本备用。

名称	厂家	备案号
细胞保存液	圣湘生物科技股份有限公司	湘长械备 20170133 号
细胞保存液	深圳市华晨阳科技有限公司	粤深械备 20160079 号
细胞保存液	深圳市麦瑞克林科技有限公司	粤深械备 20170089 号
细胞保存液	宁波海尔施基因科技有限公司	浙甬械备 20190062 号

1.2.2 样本处理

处理方法 1：取 500μL 百日咳杆菌-阴性对照及待测样本到 1.5mL 离心管，使用圣湘生物科技股份有限公司的样本释放剂（湘长械备 20150022 号）按其说明书操作进行核酸提取。

处理方法 2：取 200μL 百日咳杆菌-阴性对照及待测样本到 1.5mL 离心管，使用圣湘生物科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）按其说明书操作进行核酸提取。

1.3 加样（在样本处理区进行）

1.3.1 根据待测样本、百日咳杆菌-阴性对照、百日咳杆菌-阳性对照、百日咳杆菌-阳性参照品 A~D 的数量，每个 PCR 反应管加入 40μL PCR 混合液。

1.3.2 在装有 PCR 混合液的反应管中分别加入上述已处理的阴性对照和待测样本（吸打混匀后吸取）及阳性对照、阳性参照品 A~D 各 10μL，盖上管盖（如有气泡，可用手指弹击，去除气泡），2000rpm 离心 10 秒或用手轻甩至管壁无明显液珠。

1.4 PCR 扩增（在扩增与分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

1.4.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照、阳性参照品 A~D 以及待测样本，并设置样本名称。

1.4.2 荧光检测通道选择（以 ABI 7500 仪器为例）：

1) 选择 FAM 通道（Reporter: FAM, Quencher: none）检测百日咳杆菌 DNA；2) 选择 HEX/VIC 通道（Reporter: HEX/VIC, Quencher: none）检测内标。设置 Sample Volume 为 50。3) 参比荧光（Passive Reference）设置为 ROX。设置 Sample Volume 为 50

1.4.3 循环参数设定：

步骤	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	50℃	2 分钟
2	Taq 酶活化	94℃	5 分钟
3	变性	94℃	15 秒
3	退火, 延伸, 及荧光采集	57℃	30 秒*
4	仪器冷却	25℃	10 秒

(*注: 由于 ABI7500 仪器原因, 不能设置为 30 秒, 可以设置为 31 秒或 32 秒。)

设置完毕, 保存文件, 运行反应程序。

2. 结果分析 (请参照各仪器使用说明书进行设置)

反应结束后自动保存结果, 根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值 (用户可根据实际情况自行调整, Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20, 调整阴性对照的扩增曲线使其平直或低于阈值线), 点击 Analyze 进行分析, 使各项参数符合下述“4. 质量控制”中的要求, 然后到 Plate 窗口下记录 Ct 值。

3. 质量控制

3.1 百日咳杆菌-阴性对照: FAM、HEX/VIC 曲线均无 Ct 值显示;

3.2 百日咳杆菌-阳性对照: FAM 曲线 Ct ≤ 30; 内标 (HEX/VIC) 检测为阳性, 且 Ct ≤ 40;

3.3 百日咳杆菌-阳性参照品 A~D: FAM、HEX/VIC 均为阳性。

3.4 以上要求需在同一次实验中同时满足, 否则本次实验无效, 需重新进行。

【阳性判断值】

通过参考值的研究确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 38, 内标 Ct 的阳性判断值为 40。

【检验结果的解释】

1. 对于 FAM 通道测定 Ct 值 ≤ 38 的样本, 报告为百日咳杆菌阳性;

2. 对于 FAM 通道测定 Ct 值 > 38 或无 Ct 值且 HEX/VIC 通道检测为阳性 (Ct 值 ≤ 40) 的样本, 报告为百日咳杆菌阴性;

3. 对于 FAM 通道测定 Ct 值 > 38 的样本, HEX/VIC 通道内标 Ct 值 > 40 或无 Ct 值, 则该样本的检测结果无效, 应查找并排除原因, 并对此样本进行重新取样再进行实验 (若重复试验的检测结果仍无效, 请与本公司联系)。

【检测方法的局限性】

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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 有关假阴性结果的可能性分析

① 不合理的样本采集、处理、运送、样本中病原体滴度过低均有可能导致假阴性结果。

② 百日咳杆菌待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。

③ 不合理的试剂保存可能会导致假阴性结果。

④ 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。

3. 样本处理过程出现交叉污染, 会造成假阳性结果。

4. 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》中的要求配备设备及操作人员, 应严格按照说明书要求进行操作。

【产品性能指标】

1. 准确性

本试剂盒检测企业参考品, 阴、阳性符合率均为 100%;

2. 精密度

精密度试验表明: 批内、批间重复性好, 强阳性、中等阳性与弱阳性精密度企业参考品检测结果 Ct 值的变异系数 (CV%) ≤ 5%。

3. 样本中可能存在的干扰物质

干扰物质研究表明, 样本中常见的干扰物质 (如复方磺胺甲噁唑片 250mg/L、红霉素 40μg/mL、盐酸头孢甲肟 250mg/L、阿奇霉素 50mg/L、青霉素钠 250mg/L、克拉霉素 40μg/mL、尿素 100μg/mL、血红素 10μg/mL、纯化粘蛋白 20μg/mL、阿米卡星 100μg/mL、氯化钠 60μg/mL、莫西沙星 100μg/mL、万古霉素 100μg/mL、利奈唑胺 100μg/mL、无水乙醇 2%(v/v)、人全血 5%(v/v)) 对本试剂盒无干扰;

4. 最低检测限

本试剂盒最低检测限为 400copies/mL;

5. 特异性

与呼吸道常见病原体及感染症状相似的其他病原体 (如副百日咳鲍特菌、支气管败血鲍特菌、霍氏鲍特菌、呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、1 型副流感病毒、2 型副流感病毒、3 型副流感病毒、EB 病毒、鼻病毒、人偏肺病毒、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、粘质沙雷氏菌、嗜麦芽窄食单胞菌、肺炎链球菌、肺炎克雷伯杆菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌等) 均无交叉反应。

6. 包容性

包容性研究表明, 本试剂盒检测不同型别百日咳杆菌的检出能力好, 包容性好。

7. 临床性能

临床研究共检测样本 991 例, 其中, 686 例与病毒分离培养鉴定方法研究比较, 灵敏度为 100.00% (95% CI: 97.73%~100.00%), 特异度为 67.62% (95% CI: 63.43%~71.61%), 总符合率为 75.22% (95% CI: 71.81%~78.41%)。305 例与已上市同类产品进行研究比较, 总体样本阳性一致性百分比为 100.00% (95% CI: 94.31%~100.00%), 阴性一致性百分比为 98.76% (95% CI: 96.42%~99.74%), 总一致性百分比为 99.02% (95% CI: 97.15%~99.80%)。临床研究表明, 圣湘公司开发的“百日咳杆菌核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)”与金标准细菌培养鉴定法对照方法检测结果具有一定的相似性, 与已上市同类产品对照试剂检测结果具有较好的一致性, 满足临床应用的要求, 具有较高的临床应用价值。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测, 使用前请仔细阅读本说明书。

2. 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。

3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行, 所用消耗品应洁净, 且一次性使用, 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段用品不能交叉使用。

4. 操作待检样本时应注意防护, 实验过程中穿工作服, 戴一次性手套并经常更换手套以避免样品间的交叉污染; 样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求; 卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

5. 所有的试剂在使用前, 均需在室温下充分融化、混匀后使用。

6. 试剂盒采用泡沫箱加蓄冷剂的方式运输 5 天温度不超过 20℃ 不影响产品有效期。

【参考文献】

1. World Health Organization. Laboratory Manual for the diagnosis of whooping cough caused by bordetella pertussis[J]. 2014.

2. Nieves D J, Heininger U. Bordetella pertussis[J]. Microbiology spectrum, 2016, 4(3).

3. Bidet P, Liguori S, De Lauzanne A, et al. Real-time PCR measurement of persistence of Bordetella pertussis DNA in nasopharyngeal secretions during antibiotic treatment of young children with pertussis[J]. Journal of clinical microbiology, 2008, 46(11): 3636-3638.

4. Nakamura Y, Kamachi K, Toyozumi-Ajisaka H, et al. Marked difference between adults and children in Bordetella pertussis DNA load in nasopharyngeal swabs[J]. Clinical Microbiology and Infection, 2011, 17(3): 365-370.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 圣湘生物科技股份有限公司

住所: 长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

联系方式: 0731-88883176 传真号码: 0731-88884876

售后服务单位名称: 圣湘生物科技股份有限公司

联系方式: 0731-88883176 传真号码: 0731-88884876

生产地址: 长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

生产许可证编号: 湘药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223401564

【说明书核准日期及修改日期】2022 年 11 月 25 日

生产日期: 请见外包装箱

失效日期: 请见外包装箱