

百日咳杆菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：百日咳杆菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】25 人份/盒；50 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测 18 岁以下人群的鼻咽拭子样本中的百日咳杆菌核酸。

百日咳是由百日咳杆菌（BP）引起的一种急性呼吸道传染病，主要经飞沫传播，人群普遍易感，尤以婴幼儿多见。百日咳的临床特征为咳嗽逐渐加重，呈典型的阵发性、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。近年来，百日咳发病率出现了上升趋势，实验诊断方法有细菌培养法、抗原检测与分子生物学检测等。临床试验检测显示，本产品可特异性检测百日咳杆菌，与副百日咳鲍特菌、霍氏鲍特菌、支气管败血鲍特菌没有交叉。

本试剂盒适用于百日咳杆菌的辅助诊断，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

【检测原理】

本试剂盒根据实时荧光 PCR 技术，针对百日咳杆菌基因组保守序列设计特异性引物和 Taqman 探针，临床样本提取核酸后，通过荧光定量 PCR 仪进行扩增，同时收集荧光信号，仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线，从而实现对百日咳杆菌核酸的检测。本试剂盒设置了内参（RNase P）对照，用于对样本采集、保存和运输以及核酸提取过程进行监控，避免假阴性结果的误判。

【主要组成成分】

组分名称	规格及数量		主要成分
	25 人份	50 人份	
核酸扩增反应液	400μL×1 管	800μL×1 管	缓冲液、dN(U)TP、DNA 聚合酶、UDG
百日咳反应液	100μL×1 管	200μL×1 管	目的检测基因和 RNaseP 内参的引物、探针
阳性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	百日咳临床分离菌株液（已灭活）和 RNase P 假病毒混合液
阴性对照	500μL×1 管	500μL×1 管	生理盐水

说明：

①不同批号的组分不可以互换使用。

②自备试剂：核酸提取试剂盒，采用上海伯杰医疗科技股份有限公司生产的核酸提取及纯化试剂（沪奉械备 20180202 号）。

【储存条件及有效期】

- 避光-20℃±5℃储存，有效期 12 个月。
- 泡沫箱中加装冰袋运输，开箱温度不高于 20℃。试剂反复冻融不超过 6 次。
- 生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、Roche cobas z 480 荧光 PCR 仪、上海宏石 SLAN-96S 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

- 适用样本类型：鼻咽拭子。
- 样本采集：

推荐采用聚丙烯杆的聚酯海绵拭子、聚丙烯纤维拭子或尼龙植绒拭子进行样本采集。

鼻咽拭子采集：用一次性无菌拭子在单侧鼻腔内轻轻移动至鼻腔内部受阻处停留 10-15s 并旋转一周，将拭子放入采集管中，旋紧管盖，密封送检。

3. 样本保存：

所采集的样本应尽快进行检测，样本 2℃~8℃保存不超过 5 天，-15℃以下保存不超过 12 个月。样本应避免反复冻融，冻融次数不得超过 4 次。

【检测方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出核酸扩增反应液、百日咳反应液，室温融化，充分振荡混匀后瞬间离心。

计算试剂使用份数 N(N=样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照)，根据下表配置反应体系 mix，加入一适当体积离心管中，充分混匀后瞬间离心，按 20μL 分装至 PCR 反应管/板，并转移至样本处理区。

组分	体积 (μL) *N
核酸扩增反应液	16*N
百日咳反应液	4*N
总体积（反应体系 mix）	20*N

2. 样本处理（样本处理区）

① 核酸提取

向拭子标本管中加入 1mL 生理盐水或使用上海申启 VTM 运送培养基（沪普械备 20190053 号）和北京友康恒业病毒采样试剂盒（京械注准 20182400236），充分振荡混匀（将拭子头靠管壁挤干后丢弃）；

取 200μL 待测样本与阳性对照及阴性对照，按照核酸提取试剂盒说明书进行操作。提取后的 DNA 应尽快检测，可在-20℃±5℃保存不超过 3 个月，反复冻融不超过 4 次。

② 加样

在生物安全柜中用带滤芯的枪头往已加入反应体系 mix 的 PCR 反应管/板上分别加入处理好的待测样本核酸、阴性对照、阳性对照各 5μL，终体积为 25μL。盖紧管盖或封膜，瞬时离心后置荧光 PCR 检测仪扩增。

3. PCR 扩增检测（核酸扩增区）

①将 PCR 反应管置荧光定量 PCR 仪扩增检测。

②循环参数设定

3.1 ABI7500 和 Roche cobas z 480 荧光 PCR 仪程序设置：

步骤		温度	时间	循环数
1	预变性	95℃	5min	1cycle
2	变性	95℃	10s	40cycles
	退火/延伸/检测荧光*	55℃	40s	

3.2 上海宏石 SLAN-96S 程序设置：

步骤		温度	时间	循环数
1	预变性	95℃	5min	1cycle
2	变性	95℃	5s	40cycles
	退火/延伸/检测荧光*	60℃	15s	

说明：

①步骤 2 中*为采集荧光步骤；设置 FAM 和 ROX 进行荧光检测。

②ABI7500 荧光定量 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团均选 None。

4. 结果分析参数设定

①ABI 7500 荧光定量 PCR 仪：根据分析后扩增曲线图调节起止值，（建议起始设在 3~15、终止设在 5~20，同时调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击分析，在报告界面查看结果。

②Roche Cobas z 480 荧光 PCR 仪：根据分析后图像调节 Background 的 Min offset 值和 Max offset 值(一般将荧光值呈 S 形曲线增长前趋于水平的循环区域作为背景本底区，点击“noise band”一栏，同时调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线)，点击 calculate 获得分析结果。

③上海宏石 SLAN-96S 荧光 PCR 仪：设置中选择绝对荧光算法，点击分析，在报告界面查看结果。

【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法确定百日咳杆菌阳性判断值为 Ct 值≤38。

【检测结果的解释】

1. 质控标准

①同一实验中阴/阳性对照需同时满足以下要求，否则实验无效。

通道	检测靶标	阴性对照	阳性对照
FAM 通道	百日咳杆菌	无 Ct 值	Ct≤30
ROX 通道	内参	—	Ct≤38

②内源性 RNase P 内参质控要求：

人源样本的 RNase P 检测的 Ct 值应≤38。

2. 结果判读（在符合质控标准下进行以下判读）

检测通道		结果判读
FAM通道	ROX通道	
Ct值≤38	Ct值≤38	样本阳性
无Ct值或Ct值>38	Ct值≤38	样本阴性
—	Ct值>38	需复测，如复测内参Ct值≤38，则样本可进行正常判读；如果复测内参Ct值仍>38，则建议重新采集样本检测。

【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. 不合理的样品采集、运输、保存以及不当的试剂运输、保存、配置都可能会影响实验结果，甚至会导致假阴性结果。
3. 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。
4. 实验室污染、试剂污染、样品交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 最低检测限：1×10³copies/mL。
2. 精密性：批内、批间精密性；日内、日间精密性；操作者内、间精密性；实验室内、间精密性的 CV 均不大于 5.0%。
3. 企业参考品符合率：阳性参考品、阴性参考品符合率均为 100%。
4. 特异性：与副百日咳杆菌、支气管败血鲍特菌、霍氏鲍特菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、EB 病毒、肺炎支原体、肺炎衣原体、鼻病毒、肺炎克雷伯氏菌、流感嗜血杆菌、肺炎链球菌、人偏肺病毒、腺病毒、金黄色葡萄球菌、嗜肺军团菌、I 型流感病毒、II 型流感病毒、III 型流感病毒、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌、人型结核分枝杆菌和牛型结核分枝杆菌均无交叉反应。

5. 干扰物质：血液含量 5%，黏蛋白含量 0.9mg/mL，常用药物：如红霉素 0.5g/L、螺旋霉素 0.3g/L、罗红霉素 0.08g/L、阿奇霉素 0.13g/L、克拉霉素 0.06g/L、利巴韦林 2.2μg/mL、阿莫西林 0.05g/L、环丙沙星 0.38g/L、诺氟沙星 0.2g/L，均无干扰。

6. 临床评价：在 4 家临床单位完成 833 例样本的临床试验，与批准上市的同类试剂相比：阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.00%，总符合率为 99.28%。

【注意事项】

1. 检测前必须仔细阅读本说明书，并严格按照要求进行操作。
2. 本试剂盒为体外诊断试剂，操作要求一定的专业性，操作人员应当经过专业培训。
3. 本试剂盒检测的病原体核酸为 DNA，操作过程中使用的所有耗材应不含脱氧核糖核酸酶（DNase）和核糖核酸酶（RNase）污染。
4. 实验室操作按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》进行。实验操作必须严格分区，各区域使用的仪器、设备、耗材和工作服必须专用，不得交叉使用，避免污染。
5. 各组分使用前应室温融化，充分振荡混匀，瞬间离心后使用。
6. 反应液分装时应避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧。
7. 实验结束后，应及时清理台面，并用 10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯等措施进行消毒。
8. 试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性，实验室所有操作应符合《病原微生物实验室生物安全通用准则》；医疗废弃物处理应按照《医疗废弃物管理条例》进行管理。
9. 试剂保存运输及使用过程中多种因素可能导致性能变化，如保存运输不当、样本采集、样本处理及检测过程操作不规范等，请严格按照说明书操作。因拭子等样本采集过程及病原体感染过程本身的特点，可能存在采集到的样本量不足等原因带来的假阴性结果，应结合临床其他诊疗信息综合判断，必要时复测。

【参考文献】

- [1]Rohani P, Drake JM. The decline and resurgence of pertussis in the US[J]. Epidemics, 2011, 3(3-4): 183-188.
- [2]中华医学会儿科学分会感染学组.中国儿童百日咳诊断及治疗建议(儿科临床专家共识 2017) [J].中华儿科杂志, 2017, 55(8): 568-571.
- [3]Chen Z, Zhang J, Cao L, et al. Seroprevalence of pertussis among adults in China where whole cell vaccines have been used for 50 years[J]. J Infect, 2016, 73(1): 38-44.
- [4]李丽君, 叶金艳, 姚开虎.百日咳的实验室诊断方法研究进展 [J]. 中华传染病杂志, 2017,35(12): 765-768.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海伯杰医疗科技股份有限公司

住所：上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 1302、1303、1304、1305、1306、1307、1309 室

联系方式：4008603688 021-61984777

网址：http://www.bio-germ.com

售后服务单位名称：上海伯杰医疗科技股份有限公司

联系方式：4008603688 021-61984777

网址：http://www.bio-germ.com

生产地址：上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 502 室、1003 室、1302 室

生产许可证编号：沪药监械生产许 20202563 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20243400350

【说明书核准及修改日期】2024年02月21日