

肺炎克雷伯菌核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：肺炎克雷伯菌核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

25 人份 / 盒、50 人份 / 盒、100 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒对人痰液样本中肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumonia*, Kpn）DNA 进行荧光 PCR 定性检测。

肺炎克雷伯菌为革兰阴性杆菌，存在于人体上呼吸道和肠道，当机体抵抗力降低时，便经呼吸道进入肺而引起大叶或小叶融合性实变，以上叶较为多见。病变中渗出液粘稠而重，致使叶间隙下坠，引起组织坏死、液化、形成单个或多发性脓肿。本试剂盒可用于临床对肺炎克雷伯菌感染的辅助诊断。

【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，对肺炎克雷伯菌的特异性 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		
		25 人份	50 人份	100 人份
1	核酸抽提液	1.4 mL×2	1.4 mL×4	1.4 mL×8
2	肺炎克雷伯核酸荧光 PCR 检测混合液	972 μL×1	936 μL×2	1400 μL×3
3	酶（Taq+UNG）	10.8 μL×1	20.8 μL×1	58 μL×1
4	肺炎克雷伯阴性对照品	200 μL×1	400 μL×1	1000 μL×1
5	肺炎克雷伯阳性对照品	200 μL×1	400 μL×1	1000 μL×1
6	肺炎克雷伯内标	30 μL×1	60 μL×1	110 μL×1

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。

试剂盒反复冻融不宜超过 3 次，试剂开封后请于 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 实时荧光 PCR 仪；Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪；SLAN 荧光 PCR 检测系统及相应软件。

【样本要求】

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 1 mL，以晨痰为佳。样本应立即密闭送检。

样本可立即检测，或在 2℃~8℃可保存 7 天，长期保存应置于≤-20℃条件下，避免反复冻融。

样本运输采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封运输。

【检验方法】

A. 手工法

(1) 标本、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。

① 试剂盒自带提取试剂

核酸抽提液*配制：取 $N \times 100 \mu\text{L}$ 核酸提取液与 $N \times 1 \mu\text{L}$ 内标混匀， N =样本数。

a. **痰液**：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，取 0.5 mL 样品至 1.5mL 离心管中，再加入 0.5 mL 4% NaOH 室温放置 10 分钟后 13000 rpm 离心 5 分钟。沉淀加无菌生理盐水 1 mL 打匀，13000 rpm 离心 5 分钟；再重复洗涤一次。去尽上清，沉淀直接加入 $100 \mu\text{L}$ 核酸提取液*，振荡 10 秒，瞬时离心，99°C 干浴或水浴 10 分钟，13000 rpm 离心 10 分钟，取上清 $4 \mu\text{L}$ 作为 PCR 反应模板。

b. **对照品**：取阳性对照品、阴性对照品各 $100 \mu\text{L}$ ，分别加入 $100 \mu\text{L}$ 核酸提取液*后充分混匀，99°C 干浴或水浴 10 分钟，然后 13000 rpm 离心 10 分钟，取上清 $4 \mu\text{L}$ 作为 PCR 反应模板。

② 其它商品化提取试剂

推荐使用经验证的试剂：上海之江-核酸提取试剂盒（磁珠法）。注意提取时将 Kpn 内标 $1 \mu\text{L}$ 加入到裂解液中，后续操作按照说明书进行。

(2) 试剂配制

取 $n \times 36 \mu\text{L}$ Kpn 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），振荡混匀数秒，3000 rpm 离心数秒。

(3) 加样

取上述混合液 $36 \mu\text{L}$ 分别置于 PCR 管中，然后将样本、阳性对照品、阴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-全自动核酸提取及检测反应体系构建系统使用。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：

37°C×2min; 94°C×2min; 再按 93°C×15sec→60°C×60sec，循环 40 次; 单点荧光检测在 60°C 反应体系为 $40 \mu\text{L}$ 。

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”。

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** 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 ；阳性对照品检测结果应为：FAM 通道 Ct 值 ≤ 35 。否则实验视为无效。

5. 试验结果的判断

在质控品正常的情况下，结果判断如下：

	通道	Ct 值	结果判断
1	FAM	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	样本低于检测限，报告为肺炎克雷伯菌阴性
	VIC	≤ 38	
2	FAM	≤ 38	报告为肺炎克雷伯菌阳性
	VIC	——（见注 1）	

3	FAM	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	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 Ct	

待检样本 Ct 值在 38~40 之间，则需对核酸提取产物进行重复检测，如仍在 38~40 之间，则判为低于检测限，报告为阴性。

注 1: 对于 FAM 通道具有明显 S 型扩增曲线 ($Ct \leq 38$) 的样本，其 VIC 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线 ($Ct \leq 38$)，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 $Ct=38$ 。

【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浓度含量低于最低检出限 1×10^3 copies/mL 时可能会发生假阴性的结果。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒最低检出限： 1×10^3 copies/mL。
2. 分析特异性：本试剂盒经与百日咳杆菌、白喉杆菌、肺炎链球菌、溶血链球菌、结核杆菌、流行性脑膜炎双球菌、嗜肺军团菌、流感嗜血杆菌、呼吸道腺病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、臭鼻克雷伯氏菌、鼻硬结克雷伯氏菌、新型隐球菌、乙型肝炎病毒、人细小病毒、巨细胞病毒和人基因组均不会发生交叉反应。
3. 精密度：用高、低两个浓度的 Kpn 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 $< 5\%$ 。
4. 抗干扰能力：粘蛋白、头孢他啶、环丙沙星、泰能、左氧氟沙星、头孢吡肟、克林霉素、美满霉素、克拉维酸和舒巴坦不会对本产品的检测产生干扰。
5. 企业阳性参考品：企业阳性参考品检测结果均为阳性，阳性符合率 5/5。
6. 企业阴性参考品：企业阴性参考品检测结果均为阴性，阴性符合率 5/5。
7. 临床试验：共检测 523 例样本，以细菌培养方法作为参比方法，阳性符合率 99.10%、阴性符合率 94.66%、总符合率 95.60%。

【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；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品（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] Liu Y, Liu C, Zheng W, Zhang X, Yu J, Gao Q, Hou Y, Huang X.

PCR detection of *Klebsiella pneumoniae* in infant formula based on 16S-23S internal transcribed spacer. *Int J Food Microbiol.* 2008 Jul 31;125(3):230-5. Epub 2008 Mar 20.

[2] Justin M. Cole, et al. Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes. *JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY*, Feb. 2009, p. 322 – 326 Vol.47, No.2

【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：上海市浦东新区张江高科技产业东区瑞庆路 528 号 21 幢甲号 1 层，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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20173403243

【说明书核准及修改日期】2017-7-26