ICS 11
C 05

DB22

吉　林　省　地　方　标　准

DB 22/ T 3074—2019

呼吸道常见病原菌检测-微流控芯片法

Microfluidic chip method for detecting common pathogens of respiratory tract

2019－12－25 发布　　2020－02－01 实施

吉林省市场监督管理厅　　发 布

前　言

本标准按照 GB/T 1.1-2009 和 GB/T 20001.4-2015 给出的规则起草。

本标准由吉林省卫生健康委员会提出并归口。

本标准起草单位：吉林大学。

本标准主要起草人：姜艳芳、张鹏、刘思文、刘勇、邹红雁、司睿、李婷婷。

呼吸道常见病原菌检测-微流控芯片法

1 范围

本标准规定了呼吸道常见病原菌微流控芯片检测的原理、生物安全要求、材料与试剂、样本、检测、数据处理、质量控制、结果判定与表述、检测报告、废弃物处理与防止污染的措施。

本标准适用于呼吸道肺炎链球菌、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、流感嗜血杆菌的微流控芯片检测。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB/T 6682 分析实验室用水规格和试验方法

GB 19489 实验室 生物安全通用要求

WS/T 230-2002 临床诊断中聚合酶链式反应（PCR）技术的应用

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本标准。

3.1 微流控芯片 Microfluidic chip

检测样本在一个小的实验装置中连续完成样本核酸提取、纯化、扩增等过程，该装置也被称为芯片实验室（Lab on a Chip）。芯片上包含各种微管道、微腔室等，尺寸通常在微米级，所操作的流体通常在微升或纳升级，具有样本及试剂消耗少的特点。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

PBS：磷酸盐缓冲液（phosphate buffer solution）。

LAMP：环介导恒温扩增法（Loop mediated Isothermal Amplification）。

Spn：肺炎链球菌（Streptococcus Pneumoniae）。

Sau：金黄色葡萄球菌（Staphylococcus Aureus）。

Mrs： 耐甲氧西林葡萄球菌（methicillin-resistant Staphylococcus）。

Kpn：肺炎克雷伯菌（Klebsiella Pneumoniae）。

Pae：铜绿假单胞菌（Pseudomonas aeruginosa）。

Aba：鲍曼不动杆菌（Acinetobacter baumannii）。

Sma：嗜麦芽窄食单胞菌（Stenotrophomonas maltophilia）。

Hin：流感嗜血杆菌（Haemophilus influenzae）。

5 原理

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。

在微流控芯片上，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，扩增阳性的样品会产生类似“S”形扩增曲线一步完成对靶基因的扩增和检测。

6 生物安全要求

采样及检测过程所涉及的实验操作应按 GB 19489 规定执行。

7 材料与试剂

7.1 仪器与耗材

7.1.1 II 级生物安全柜。
7.1.2 涡旋混合仪。
7.1.3 金属浴或水浴锅。
7.1.4 高压灭菌器。
7.1.5 微量移液器：10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。
7.1.6 微量带滤芯吸头：10 μL、100 μL、200 μL、1000 μL。
7.1.7 医用冰箱：2 ℃～8 ℃、-20 ℃、-80 ℃。
7.1.8 低温高速离心机，最高离心力达 15 000 r/min 以上。
7.1.9 低速离心机，最高离心力达 1 000 r/min 以上。
7.1.10 恒温扩增微流控芯片核酸分析仪。
7.1.11 核酸快速提取仪。
7.1.12 芯片封口膜。
7.1.13 微流控芯片。
7.1.14 离心管：200 μL、1.5 mL、15 mL。

7.2 试剂

7.2.1 试剂级别：除另有规定，本方法试验用水应符合 GB/T 6682 规定的二级水，所用化学试剂均为分析纯。
7.2.2 10%氢氧化钠溶液。
7.2.3 核酸提取试剂（等效商品化试剂）。
7.2.4 恒温扩增试剂（等效商品化试剂）。

8 样本

8.1 采集

8.1.1 清晨采集患者漱口后从肺深处咳出的痰液 1 mL～2 mL。

8.1.2 样本接收记录表参见附录 A。

8.2 保存和运输

8.2.1 待检样本在室温（15 ℃～30 ℃）下最多可以保存 3 d，在 4 ℃下可保存 4 d～10 d，-20 ℃保存不超过 3 个月，-80 ℃以下长期保存。

8.2.2 应置于低温、密闭的无菌容器内运输。

8.3 接收和拒收

检测实验室应制定样本接收要求，可拒绝接收以下样本：

a) 样本量不满足 8.1.1 要求或含血量过高；
b) 没有按照 8.2 规定保存和运输的样本。

9 检测

应在生物安全柜内按照以下步骤进行操作：

a) 将痰液转移到 15 mL 离心管中，加入等体积的浓度为 10%的氢氧化钠溶液（配方见附录 B.1）。在漩涡混合器上震荡,37 ℃液化 30 min；
b) 取 1 mL 液化后的样本到 1.5 mL 离心管中，12 000 r/min 离心 5 min，弃上清；
c) 向离心管中加入 1 mL PBS（配方见附录 B.2），涡旋振荡， 12 000 r/min 离心 5 min，弃上清，用移液器将离心管中剩余液体吸尽；
d) 向离心管中加入 100 μL 核酸提取试剂，用移液器吹吸沉淀，将液体和沉淀一起转移到 1.5 mL 离心管中；
e) 将离心管置于核酸快速提取仪中，最大转速振荡 5 min；
f) 将离心管置于 95 ℃金属浴中，加热 5 min；
g) 10 000 r/min 离心 5 min，待用,要求核酸浓度不低于 5 ng/μL；
h) 将提取的基因组 DNA 与恒温扩增试剂进行混合，同时设置阴性和阳性对照；
i) 将混合液加入到微流控芯片中，贴好封口膜，短暂离心；
j) 在恒温扩增微流控芯片核酸分析仪中进行 LAMP 反应，参数见表 1。

表1 LAMP 反应参数

步骤	温度 ℃	时间 min
1	37	3
2	65	47

10 数据处理

检测完成后，计算机自动进行数据分析。

11 质量控制

11.1 实验室对照品

11.1.1 阳性对照品为 IRMM-449 大肠埃希氏菌基因组 DNA；阴性对照品为实验室灭菌纯水。
11.1.2 阳性对照品检测结果为阳性；阴性对照品检测结果为阴性。

11.2 芯片对照

芯片上自带质量控制体系：
a) 阳性质控；
b) 阴性质控。

12 结果判定与表述

12.1 判定

12.1.1 当检测指标值小于或等于该指标阳性判断值时，判定为阳性。
12.1.2 当检测指标值大于该指标阳性判断值时，判定为阴性。
12.1.3 各指标阳性判断值见表 2。

表2 各指标的阳性判断值

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

12.2 表述

12.2.1 如判定结果为阳性，则结果表述为“阳性 +”。
12.2.2 如判定结果为阴性，则结果表述为“阴性 -”。

13 检测报告

应由具备临床医学检验技术资质的医务人员审核并签发，报告模板参见附录C。

14 废弃物处理和防止污染的措施

14.1 废弃物应经 121 ℃高压灭菌 30 min 后再弃置。
14.2 污染的预防和控制措施应按 WS/T 230-2002 中第 6 章执行。

附 录 A
（资料性附录）
样本接收记录表

样本接收记录表见表 A.1。

表A.1

序号	姓名	开单科室	住院号/门诊号	检测项目	条码号	接收日期	样本类型	样本状态	门诊接收人	实验室接收人	检测者
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			
		□男 □女						□ 正 常 □___			

附 录 B
（规范性附录）
试剂的配制

B.1 10%氢氧化钠溶液

称取10 g氢氧化钠，加入90 mL双蒸水中，充分溶解，室温保存。

B.2 0.01 mol/L pH7.6 PBS

B.2.1 先配制A液、B液。

B.2.2 A液(0.2 mol/L NaH_2PO_4溶液)：称取一水合磷酸二氢钠($NaH_2PO_4·H_2O$)27.6 g，或二水合磷酸二氢钠($NaH_2PO_4·2H_2O$)31.2 g，溶于蒸馏水中，定容至1 L。

B.2.3 B液(0.2 mol/L Na_2HPO_4溶液)：称取十二水合磷酸氢二钠($Na_2HPO_4·12H_2O$)71.6 g，或二水合磷酸氢二钠($Na_2HPO_4·2H_2O$)35.6 g，溶于蒸馏水中，定容至1 L。

B.2.4 称取17 g氯化钠，用适量蒸馏水溶解，量取13 mL A液和87 mL B液，混合，用蒸馏水定容至2 L。

B.2.5 用盐酸调节pH至7.6。

附 录 C
（资料性附录）
报告模板

报告模板见 C.1。

表C.1

姓名：	性别：	年龄：	样本类型：
诊断：	科室：	门诊号：	送检医生：
病区：	床号：	条码号：	样本号：

检测项目	测定结果	参考范围
肺炎链球菌（Spn）		阴性
金黄色葡萄球菌（Sau）		阴性
肺炎克雷伯菌（Kpn）		阴性
铜绿假单胞菌（Pae）		阴性
鲍曼不动杆菌（Aba）		阴性
嗜麦芽窄食单胞菌（Sma）		阴性
流感嗜血杆菌（Hin）		阴性
耐甲氧西林葡萄球菌（Mrs）		阴性

采样时间：	接收时间：	报告时间：
检验者：	审核者：	备注：
注：本报告仅对本次所检测的样本负责。		