

肺炎链球菌/流感嗜血杆菌/卡他莫拉菌核酸检测试剂盒
(荧光 PCR 法) 说明书

【产品名称】

通用名称：肺炎链球菌/流感嗜血杆菌/卡他莫拉菌核酸检测试剂盒
(荧光 PCR 法)

【包装规格】24 人份/盒、48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人痰液样本中的肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌的核酸 DNA。

本试剂盒用于下呼吸道感染人群的肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和卡他莫拉菌感染的辅助诊断，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

肺炎链球菌 (*Streptococcus pneumoniae*, SP)、流感嗜血杆菌 (*Haemophilus influenzae*, HI) 和卡他莫拉菌 (*Moraxella catarrhalis*, MC) 是常见的条件致病菌，准确及时的检测对于患者诊疗具有非常重要的临床意义。

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。

【检验原理】

本试剂盒分别选取肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌基因组中相对保守的区域设计特异性引物和探针，采用实时荧光定量 PCR 技术对样本 DNA 进行检测。PCR 扩增过程中，探针与模板结合，其 5'端报告基团被 Taq 酶 5'→3'外切核酸酶活性切断，使报告基团远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，并计算出样本 Ct 值 (每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数)。引物探针混合液中分别使用 FAM、VIC、CY5 荧光基团标记肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌探针，在同一体系中可同时进行以上三种细菌核酸的定性检测。

本试剂盒反应体系含有 dUTP-UDG 防污染措施，可以有效地防止实验室内扩增产物的污染；另外，本试剂盒采用内源性内标质控体系，通过内标可对待测样本的采集、运输和提取过程进行监控，也可对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制。内标荧光标记为 ROX。

【主要组成成分】

序号	组分名称	主要成分	规格及数量	
			24 人份	48 人份
1	肺链嗜血卡他-扩增反应液	Tris-HCl, KCl, Mg ²⁺ , dN(UTP, 耐热 DNA 聚合酶, UDG 酶	840μL ×1 管	840μL ×2 管
2	肺链嗜血卡他-引物探针混合液	肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌及内标的引物探针	120μL ×1 管	120μL ×2 管
NC	肺链嗜血卡他-阴性对照	内标基因片段	400μL ×1 管	400μL ×1 管
PC-h	肺链嗜血卡他-强阳性对照	含肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌和内标基因片段的灭活工程菌	400μL ×1 管	400μL ×1 管
PC-l	肺链嗜血卡他-弱阳性对照	含肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌和内标基因片段的灭活工程菌	400μL ×1 管	400μL ×1 管

备注：不同批号试剂盒中各组分不能互换。

需要但未提供试剂：

序号	名称	生产企业	备案编号
1	核酸提取试剂	北京卓诚惠生生物科技股份有限公司	京昌械备 20200008
2	核酸提取试剂	北京卓诚惠生生物科技股份有限公司	京昌械备 20200083

【储存条件及有效期】

-20±5℃ 保存，有效期 12 个月。

开盖后置于 2~8℃ 保存，有效期为 15 天。避免反复冻融 (冻融次数不得超过 7 次)。

采用干冰和冰袋密封运输，运输温度不高于 0℃，运输时间不宜超过 5 天。

冷链运输：运输温度为-20±5℃，运输时间不宜超过 5 天。

生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：痰液

2. 样本采集

采用无菌痰液样本收集盒。患者留取的痰液样本，应由检验人员或经培训的专业人员目视检查样本质量：样本量一般在 3~5mL，如为唾液样本等不合格样本，应在专业人员的进一步指导下取样后重新送检。

3. 样本保存

样本应尽快检测，2~8℃ 条件下可以保存 72 小时，-20±5℃ 条件下可以保存 12 个月，在-90~-70℃ 条件下可保存 48 个月。冻存的样本反复冻融后应充分混匀，避免 5 次以上反复冻融。提取后的核酸可于-20±5℃ 条件下保存 12 个月，反复冻融不超过 5 次。

【检验方法】

试剂盒使用前将所需组分提前取出，室温融化，短暂震荡，瞬时离心。

一、样本处理 (样本处理区)

1. 样本前处理

NaOH 法：将痰液样本加到 50mL 带螺旋盖的试管中，视痰液的粘稠度，加入 1~4 倍体积 4%NaOH 消化液于痰液管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡 1 分钟，室温于生物安全柜内放置 15~20 分钟，使痰液充分液化。

DTT 法：将痰液样本加到 50mL 带螺旋盖的试管中，视痰液的粘稠度，加入 1~4 倍体积 0.1%DTT 消化液于痰液管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡 1 分钟，室温于生物安全柜内放置 30 分钟，使痰液充分液化。

任选其中一种方法，均可用于样本前处理。

2. 样本提取

取强阳性对照、弱阳性对照、阴性对照和处理后的待测样本各 200μL 进行提取，具体提取步骤请参照相应提取试剂说明书。

二、PCR 试剂配制 (试剂准备区)

1. 体系配制

按 N 个 (N=待测样本数+强阳性对照+弱阳性对照+阴性对照) 反应配制体系，反应体系配制如下表。

试剂盒组分	反应体系
肺链嗜血卡他-扩增反应液	35μL ×N
肺链嗜血卡他-引物探针混合液	5μL ×N
总体积	40μL ×N

2. 体系分装

将上述反应液混匀离心后，按照每管 40μL 分装于荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

三、加样 (样本处理区)

在分装好试剂的反应体系中分别加入 10μL 提取的待测样本核酸、强阳性对照、弱阳性对照及阴性对照核酸，总反应体积为 50μL。盖紧 PCR 反应管管盖，瞬时离心将管壁上液体全部甩到管底，然后立即进行 PCR 扩增反应。

四、PCR 扩增检测 (扩增检测区)

检测通道：肺炎链球菌选择 FAM 通道、流感嗜血杆菌选择 VIC 通道、卡他莫拉菌选择 CY5 通道，内标选择 ROX 通道，对应内源性内标质控。ABI 7500 仪器中“Quencher Dye”和“Passive Reference”均设置为 None。按照样本对应顺序设置强阳和弱阳性对照 (Positive Control)、阴性对照 (Negative Control) 和样本 (Unknown)，并设置样本名称。

程序设置如下：

序号	阶段	温度 (℃)	时间	循环数
1	预反应	50	2 分钟	1
		95	5 分钟	
2	变性	95	15 秒	40
	退火，延伸，采集信号	55	30 秒	

五、阈值设定

根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值 (Start 值建议设在 3~15、End 值建议设在 5~20) 以及 Threshold 的 Value 值，同时调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线，点击 Analysis 自动获得分析结果，在 Report 界面察看结果。

六、实验有效性判断

1. 强阳性对照：FAM、VIC、CY5 和 ROX 通道有 S 型曲线，且 Ct 值≤28。

2. 弱阳性对照：FAM、VIC、CY5 和 ROX 通道有 S 型曲线，且 Ct 值≤36。

3. 阴性对照：FAM、VIC、CY5 通道无 S 型曲线，Ct 显示为 Undetermined；ROX 通道有 S 型曲线，且 Ct 值≤36。

注：条件 1、2、3 必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值】

阳性判断值通过对 417 例临床样本的检测数据采用受试者工作特征

曲线（ROC 曲线）法计算得到。确定本试剂盒肺炎链球菌的阳性判断值为 **Ct=36**，流感嗜血杆菌的阳性判断值为 **Ct=36**，卡他莫拉菌的阳性判断值为 **Ct=36**。

【检验结果的解释】

1. 在仪器正常，强阳性对照、弱阳性对照和阴性对照检测结果符合质控标准的情况下，如果内标（ROX）通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36 并具备如下条件，判为阳性：

通道	Ct 值	结果判读
FAM	Ct≤36	肺炎链球菌阳性
VIC	Ct≤36	流感嗜血杆菌阳性
CY5	Ct≤36	卡他莫拉菌阳性

注：对于 FAM、VIC 或 CY5 通道具有明显 S 型扩增曲线的样本，内标（ROX）通道无 S 型扩增曲线或 Ct 值>36，可能因为高浓度样本的抑制作用导致，不影响结果判读。

2. 如果内标（ROX）通道出现 S 型扩增曲线（Ct≤36），同时 FAM、VIC 和 CY5 通道检测无 S 型扩增曲线（或目标 Ct 值>36），则判定对应目标结果为阴性。

3. 如果 FAM、VIC 和 CY5 通道及 ROX 通道均未出现明显的 S 型扩增曲线（或目标及内标 Ct 值>36），原因分析及建议：（a）采样不合格，建议重新采样检测；（b）核酸提取过程异常，导致核酸损失，建议重新提取检测；（c）样本中存在抑制 PCR 反应的物质，可对样本进行稀释后检测。

【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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 本试剂盒检测的靶序列为肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌基因的保守区域，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. 有关假阳性结果的可能性分析

3.1 如果样本在运输、处理过程中发生交叉污染，则可能导致假阳性结果。

3.2 实验环境有 PCR 产物等气溶胶污染，则可能导致假阳性结果。

3.3 实验过程中使用的耗材、设备等受污染，则可能导致假阳性结果。

4. 有关假阴性结果的可能性分析

4.1 不合理样本采集、转运及处理，检测样本中被检测核酸浓度含量低于最低检出限时均有可能导致假阴性结果。

4.2 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 最低检出限：肺炎链球菌的最低检出限为 100 CFU/mL，流感嗜血杆菌的最低检出限为 1250 CFU/mL，卡他莫拉菌的最低检出限为 1000 CFU/mL。

2. 精密性：检测经稀释的《34 种细菌和真菌感染多重核酸检测试剂国家参考品》M1 和 M4，各重复检测 10 次，M1 为肺炎链球菌阳性，M4 为流感嗜血杆菌阳性，且 Ct 值变异系数均（CV，%）≤5.0%；或检测企业精密性参考品 R1、R2 和 R0，各重复检测 10 次，R1 和 R2 检测结果均为肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌阳性，且 Ct 值变异系数（CV，%）均≤5.0%，R0 检测结果均为阴性；使用 3 批试剂盒连续 20 天，每天由 2 名操作人员在两个不同的实验室对企业精密性参考品及临床样本进行重复检测，其重复性、批间差、中间精密度和再现性良好，各检测结果的 Ct 值变异系数（CV，%）均≤5.0%。

3. 阳性参考品符合率：分别检测《34 种细菌和真菌感染多重核酸检测试剂国家参考品》M1、M4 和企业参考品 P17-P20，M1 为肺炎链球菌阳性，M4 为流感嗜血杆菌阳性，P17-P20 为卡他莫拉菌阳性，不在产品检测范围内的病原菌检测结果均为阴性；或检测 20 份企业阳性参考品，符合率（+/-）为 20/20。

4. 阴性参考品符合率：分别检测《34 种细菌和真菌感染多重核酸检测试剂国家参考品》M2、M3、M5、M6 和 M7，检测结果均为阴性；或检测 9 份企业阴性参考品，符合率（-/-）为 9/9。

5. 交叉反应：针对可能与检测样本产生交叉的其他病原菌（浓度水平为 10⁶CFU/mL~10⁷CFU/mL 的铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、肺炎克雷伯菌、大肠埃希氏菌、阴沟肠杆菌、洋葱伯克霍尔德菌、粪肠球菌、屎肠球菌、金黄色葡萄球菌、百日咳杆菌、结核分枝杆菌、嗜肺军团菌、表皮葡萄球菌、诺卡菌、柠檬酸杆菌、唾液链球菌、化脓性链球菌、副流感嗜血杆菌、脑膜炎奈瑟氏菌、粘质沙雷菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、白色念珠菌、黄曲霉菌、新型隐球菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、缓症链球菌、嗜链球菌、副溶血嗜血杆菌、杜克嗜血杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、产气克雷伯菌、口腔链球菌、溶血嗜血杆菌；浓度水平为 10⁶ PFU/mL 的甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、EB 病毒、肠道病毒、水痘带状疱疹病毒、呼吸道合胞病毒、人博卡病毒、人偏肺病毒、人鼻病毒、腺病毒；浓度水平为 10⁷ copies/mL 的耶氏肺孢子菌、新型冠状病毒），无交叉反应。

6. 干扰物质：对 2.0 mg/mL 粘蛋白、5%血液、100 ng/μL 人基因组 DNA、15%唾液进行检测，检测结果未产生显著影响；针对 10⁶CFU/mL 浓度水平的口腔细菌：唾液链球菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、乳酸杆菌进行验证，针对治疗呼吸道感染的抗菌药物：阿奇霉素（8μg/mL）、头孢地尼（9μg/mL）、庆大霉素（10mg/mL）、亚胺培南（5mg/mL）、环丙沙星（2.5μg/mL）、左氧氟沙星（5.0mg/mL）、阿莫西林（10.8μg/mL）、利巴韦林（60mg/mL）、奥司他韦（7.5mg/mL）、多西环素（1.8mg/L）、羟甲唑啉（25ng/mL）、氯化钠（0.45%）、万古霉素（60μg/mL）、利奈唑胺（30μg/mL）、氟康唑（10μg/mL）、肾上腺素（0.96mg/mL）、倍氯米松（400μg）、地塞米松（0.96mg/mL）、氟尼缩松（150μg）、曲安西龙（0.011 mg/mL）、布地奈德（256μg/mL）、莫美他松（200μg）、氟替卡松（0.39ng/mL）、莫匹罗星（4.49mg/mL）、盐酸组胺（300ng/mL）、妥布霉素（4μg/mL）进行验证，均未对检测结果产生显著影响。

7. 临床试验结果：本试剂盒在三家临床检测机构完成了临床试验，采用一代测序法/对比试剂/分离培养法/临床诊断标准作为对比方法。

与一代测序法比对，共入组 729 例样本，肺炎链球菌阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 99.81%。流感嗜血杆菌阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 99.81%。卡他莫拉菌阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 100.00%。

与对比试剂比对，肺炎链球菌阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 99.17%。流感嗜血杆菌阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 99.16%。

与临床诊断标准比对，卡他莫拉菌灵敏度为 100.00%，特异度为 90.54%。

【注意事项】

1. 开始检测前请仔细阅读本说明书，本品仅用于体外诊断，请在有效期内使用。

2. 本试剂盒不含有人源性或动物源性物质。

3. 使用本产品时，临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》等有关分子生物学实验室要求执行。

4. 样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。

5. 实验后的废弃物，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。加样本吸头用后打入盛有 1%次氯酸的废物缸里。实验完毕后使用 1%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面，然后紫外灯照射 25-30 分钟。

6. 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。

【参考文献】

1. 《病原微生物实验室生物安全通用准则（WS 233-2017）》

2. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发〔2010〕194 号

3. 《医疗废物管理条例》

4. Jamal W, Al Roomi E, AbdulAziz LR, Rotimi VO. Evaluation of Curetis Unyvero, a multiplex PCR-based testing system, for rapid detection of bacteria and antibiotic resistance and impact of the assay on management of severe nosocomial pneumonia. J Clin Microbiol 2014;52:2487-92.

5. Kais M, Spindler C, Kalin M, Ortqvist A, Giske CG. Quantitative detection of Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis in lower respiratory tract samples by real-time PCR. Diagn Microbiol Infect Dis. 2006 Jul;55(3):169-78. doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.01.007. Epub 2006 Apr 19. PMID: 16626914.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京卓诚惠生生物科技股份有限公司

住所：北京市昌平区生命科学园科学园路 37 号院 1 号楼 C 座 101 室

联系方式：

售后服务单位名称：北京卓诚惠生生物科技股份有限公司

联系方式：

生产地址：北京市昌平区沙河镇昌平路 97 号 5 幢 C 门 101、6 幢 504，7 幢 304

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】