



肺炎链球菌/肺炎支原体/流感嗜血杆菌核酸联合检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书



【产品名称】

肺炎链球菌/肺炎支原体/流感嗜血杆菌核酸联合检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

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肺炎链球菌 (SP)、肺炎支原体 (MP) 和流感嗜血杆菌 (HI) 脱氧核糖核酸 (DNA)。

本产品适用于下呼吸道感染患者的肺炎链球菌、肺炎支原体和流感嗜血杆菌病原体感染肺炎的辅助诊断。

下呼吸道感染是我国临床上最常见的疾病之一，可引发咽痛、头痛、发热、乏力、肌肉酸痛、食欲减退、恶心、呕吐等症状，导致肺炎、鼻窦炎、中耳炎、化脓性脑膜炎、败血症、脓胸等疾病，诱发较高的发病率和病死率。社区获得性肺炎 (community-acquired pneumonia, CAP) 是临床最常见的下呼吸道感染性疾病之一，而肺炎链球菌、肺炎支原体和流感嗜血杆菌是导致社区获得性肺炎的重要病原体。目前临床上主要采用生化指标鉴定、病原体培养等方式确定感染病原体，但周期较长且分离培养较困难，阳性率低。本产品采用荧光PCR技术对上述三种病原体进行核酸定性检测，适用于相关病原体肺炎的辅助诊断。结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒基于荧光 PCR 方法的原理结合 Taqman 荧光探针技术，采用四色荧光 PCR 在全封闭的扩增体系中检测 SP 特异性基因 *lytA*、MP 特异性基因 *P1* 和 HI 特异性基因片段 *OmpP6*，同时针对人的 β -珠蛋白基因 (β -globin) 保守区域设计特异性引物和探针作为内参对样本的采集、DNA 的提取及扩增进行监控。

【主要组成成分】

类别	组成	规格	数量	主要成分
核酸扩增试剂	1、SP/MP/HI 内标扩增反应液	1.0mL/支	1 支	引物、探针、dNTPs 酶
	2、Taq DNA 聚合酶	15 μ L/支	1 支	
质控品	3、SP/MP/HI 阳性对照	200 μ L/支	1 支	质粒菌 Hep-2 细胞
	4、SP/MP/HI 阴性对照	200 μ L/支	1 支	

试剂盒不提供但需准备的仪器和耗材：

- 1) 0.6mL 或 1.5mL 离心管 (推荐 AXYGEN)；
- 2) 八排管或 96 孔板 (推荐 AXYGEN)；
- 3) 移液器 (10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L)；
- 4) Tip 头 (10 μ L、100 μ L、200 μ L、1000 μ L)；
- 5) 离心机 (手掌型离心机；高速离心机，转速 $\geq$ 13000rpm) 等。
- 6) 使用广东和信健康科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (粤穗械备 20150194 号) 进行核酸提取。

【储存条件及有效期】

试剂盒未开封情况下于 -25℃~-15℃ 避光保存，有效期 18 个月。

试剂盒开瓶后在 -25℃~-15℃ 避光保存，有效期为 6 个月。

试剂盒冻融 5 次以内性能稳定，超过 5 次未验证，应尽量避免反复冻融。

生产日期及失效日期：见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 Real-Time PCR System；上海宏石医疗科技有限公司 Slan 荧光 PCR 检测系统 (SLAN-96P)；西安天隆科技有限公司的实时荧光定量 PCR 仪 (TL988)

【样本要求】

1. 样本类型：痰液。
2. 样本采集：样本来源于门诊病例或住院病例。采集疑似下呼吸道感染患者的痰液，要求白细胞数大于 25/低倍视野且上皮细胞小于 10/低倍视野为合格痰标本，样本量应不少于 0.6mL，置于样本收集管中。
3. 样本保存：
痰液样本 2℃~8℃ 保存，不超过 72 小时；也可保存于 -25℃~-15℃ 待测，保存期为 6 个月；-70℃ 可保存 3 年；应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。核酸样本在 2℃~8℃ 可保存 72 小时；-25℃~-15℃ 可保存 3 个月；-70℃ 可保存 6 个月；应避免反复冻融，冻融次数应不超过 3 次。

【检验方法】

一、样本处理

1. 向痰液样本中加入 2 倍体积 4% 氢氧化钠溶液，静置 30 分钟，待其充分液化，在液化过程中可震荡 2-3 次，如痰液粘稠，可适当延长液化时间；
2. 待其完全呈液态状态（无明显粘稠物），取 1mL 加入离心管，13000rpm 离心 5 分钟；
3. 弃上清，加入 1mL 生理盐水洗涤沉淀，13000rpm 离心 5 分钟；
4. 弃上清，沉淀加入 100μL 生理盐水，震荡混匀待用；
5. 取待测样本 50 μL，质控品（阳性对照和阴性对照）50 μL，进行提取，严格按照说明书操作。

二、PCR 扩增

1. 配液：取出 SP/MP/HP/内标扩增反应液，室温融化后充分混匀，短暂离心，并按反应个数 n ($n = \text{样本数} + 2 \text{ 个外标质控品}$) 分别取反应液和酶按照以下配比配置反应液：

试剂	SP/MP/HP/内标扩增反应液	Taq DNA 聚合酶
用量 (n 人份)	$20\mu\text{L} \times n$	$0.3\mu\text{L} \times n$

计算好各试剂用量，加入适当体积于离心管中，充分混匀，短暂离心，然后按 20μL/管分装到 PCR 反应管中；

2. 加样：分别加入 5μL 处理好的样本核酸、阳性对照和阴性对照，盖紧管盖，短暂离心；

注：加样完成，若不立即上机测试，可在 2℃~8℃ 保存 6 小时。

3. PCR 扩增：

将 PCR 反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。ROX/FAM/VIC/CY5 四种荧光同时勾选，其中 ROX 荧光指示肺炎链球菌，FAM 荧光指示肺炎支原体，VIC 荧光指示流感嗜血杆菌，CY5 荧光指示内标 β -globin，荧光采集为 Stage2 Step2 (55℃ 00:35)。循环参数设定：

步骤	循环数	温度	时间
1	1	94℃	2 分钟
2	40	94℃	10 秒
		55℃	35 秒

注：1、如使用 ABI 7500 Real-Time PCR System，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”；

2、若与本公司 RT-PCR 试剂盒同时进行，可在步骤 1 前增加步骤（48℃，5 分钟，循环数为 1），此程序已验证。

三、结果分析

1. 反应结束后，根据相关仪器的软件进行分析。
2. 分析条件设置：根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值、end 值（可根据试验情况自行调整，一般情况下 start 值可变范围在 1~10，end 值可变范围在 5~20）。阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照曲线（无规则噪音线）的最高点为准。
3. 记录仪器自动分析计算出的样本 Ct 值。

四、质量控制

1. 阴性对照：SP、MP、HP 均无 S 型扩增曲线，Ct 值显示为 Undet；内标 Ct 值 ≤ 30 ；
2. 阳性对照：SP、MP、HP 均有典型的 S 型阳性扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 30.00 ；
3. 上述两个条件必须同时满足，否则，本次试验无效。

【阳性判断值】

收集不同地域的痰液样本共 327 例采用 ROC 曲线法进行阳性判断值建立，纳入 429 例痰液样本进行阳性判断值验证，确定本试剂盒肺炎链球菌的阳性判断值为 Ct 值 ≤ 33.64 ，肺炎支原体的阳性判断值为 Ct 值 ≤ 35.37 ，流感嗜血杆菌的阳性判断值为 Ct 值 ≤ 32.84 ，内标阳性判断值为 Ct 值 ≤ 33.31 。

【检验结果的解释】

在实验有效的前提下，检验结果依据表 1 和表 2 进行判断。

表 1 各荧光通道 Ct 值和阴、阳性结果判断

荧光通道（靶基因）	Ct 值	各荧光通道阴、阳性判断结果
CY5（内标）	Ct 值 > 33.31 或 Undet	阴性结果
	Ct 值 ≤ 33.31	阳性结果
ROX（SP）	Ct 值 > 33.64 或 Undet	阴性结果
	Ct 值 ≤ 33.64	阳性结果
FAM（MP）	Ct 值 > 35.37 或 Undet	阴性结果
	Ct 值 ≤ 35.37	阳性结果
VIC（HP）	Ct 值 > 32.84 或 Undet	阴性结果
	Ct 值 ≤ 32.84	阳性结果

表 2 SP、MP 和 HI 检测结果判定



内标	SP	MP	HI	结果判定
+	-	-	-	SP、MP、HI 全部阴性
+或-	+	-	-	SP 阳性，MP、HI 阴性
+或-	+	+	-	SP、MP 阳性，HI 阴性
+或-	+	-	+	SP、HI 阳性，MP 阴性
+或-	+	+	+	SP、MP、HI 全部阳性
+或-	-	+	-	SP、HI 阴性，MP 阳性
+或-	-	+	+	SP 阴性，MP、HI 阳性
+或-	-	-	+	SP、MP 阴性，HI 阳性
-	-	-	-	PCR 反应失败，可能是 DNA 样品制备过程中有抑制物，建议将 DNA 稀释 10 或者 100 倍后重复测定，如果有荧光信号，则按上述判定结果，否则重新进行采样

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性

【检验方法的局限性】

- 1. 本试剂盒适用于辅助临床诊断，结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。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. 不合理的样本采集、转运及处理、样本中浓度过低均有可能导致假阴性结果。

【产品性能指标】

- 1. 使用流感嗜血杆菌和肺炎链球菌国家参考品进行检测，结果均符合国家参考品要求。
- 2. 使用企业参考品进行检测，结果均符合企业参考品要求。
- 3. 最低检出限：采用各病原体临床常见的不同亚型进行研究，肺炎链球菌包括 6A、6B（26）、14、19A、19F、23 型，肺炎支原体 I 型和 II 型，流感嗜血杆菌包括 a、b、c、d、e、f 型，确定检测肺炎链球菌的最低检出限为 1×10^3 CFU/mL，检测肺炎支原体的最低检出限为 5×10^2 copies/mL，检测流感嗜血杆菌的最低检出限为 1×10^3 CFU/mL。
- 4. 精密度：采用阴性、弱阳性、强阳性样本由 2 位操作者进行连续 20 天的精密度研究，阴性样本的阴性符合率为 100%，弱阳性样本的阳性检出率为 100%，强阳性样本的阳性检出率为 100%且检测结果的 Ct 值的 CV $\leq$ 5.0%。
- 5. 分析特异性
 - (1) 交叉反应：本试剂盒与风疹病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、金黄色葡萄球菌、大肠杆菌、铜绿假单胞菌、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、呼吸道合胞病毒 A 型、副流感病毒 1 型、MDCK 细胞、Hep-2 细胞、呼吸道合胞病毒 B 型、巨细胞病毒、甲型流感病毒、肺炎衣原体、乙型流感病毒、副流感病毒 2 型、副流感病毒 3 型、奈瑟氏菌属（脑膜炎奈瑟菌、淋球菌）、乳酸杆菌（干酪乳杆菌、卷曲乳杆菌）、腺病毒 3 型、肠炎沙门氏菌、乙型溶血性链球菌、普通变形杆菌、EB 病毒、嗜肺军团菌、表皮葡萄球菌、博卡病毒、单纯疱疹病毒 1 型、水痘带状疱疹病毒、百日咳杆菌、棒状杆菌、卡他莫拉菌、结核分枝杆菌、化脓性链球菌、粘质沙雷菌、白念珠菌、口腔链球菌、肺炎克雷伯菌、冠状病毒（OC43）、冠状病毒（229E）、偏肺病毒和肺孢子菌均不会发生交叉反应。
 - (2) 内源/外源物质干扰试验：在药峰浓度下的常见药物如肾上腺素（苯福林）、羟甲唑啉、氯化钠（含防腐剂）、倍氯米松、地塞米松、氟尼缩松、曲安奈德、布地奈德、莫米松（莫美他松）、氟替卡松、硫磺、金英、盐酸组胺、苯佐卡因、薄荷脑、扎那米韦、利巴韦林、奥司他韦、帕拉米韦、莫匹罗星、盐酸头孢吡肟、妥布霉素、穿琥宁、阿司匹林、布洛芬、对乙酰氨基酚、尼美舒利均不会干扰本试剂盒检测；5%血液、1%粘蛋白及鼻内活流感病毒疫苗不会干扰本试剂盒检测。
 - (3) 竞争性干扰：经验证与肺炎链球菌近源的常见菌种（无乳链球菌、乙型溶血性链球菌、缓型链球菌、口腔链球菌、化脓性链球菌、唾液链球菌），与流感嗜血杆菌近源的常见菌种（埃及嗜血杆菌、副流感嗜血杆菌、副溶血嗜血杆菌、杜克嗜血杆菌），与肺炎支原体主要检测呼吸道的其他病原体（肺炎衣原体、嗜肺军团菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌）对本试剂盒检测结果无干扰；经验证试剂盒内各病原体在浓度高至 10^6 CFU/mL 下不影响低浓度样本的检测。
- 6. 临床性能：在三家临床单位共进行 739 例临床样本的检测，结果总结如下：

符合率 病原体	阳性符合率	阴性符合率	总符合率	Kappa 值
SP	100% (95%CI: 99.84%~100%)	99.29% (95%CI: 98.59~99.98%)	99.46% (95%CI: 98.93%~99.99%)	0.9853
MP	98.34% (95%CI: 96.48%~100%)	99.82% (95%CI: 99.47%~100%)	99.46% (95%CI: 98.93%~99.99%)	0.9853
HI	97.77% (95%CI: 96.00%~99.53%)	99.36% (95%CI: 98.64%~100%)	98.78% (95%CI: 97.99%~99.57%)	0.9736

注：SP 为肺炎链球菌、MP 为肺炎支原体、HI 为流感嗜血杆菌。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外检测。
2. 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，严格按操作步骤执行；不使用本试剂盒提供的组分或不按照说明书进行实验将可能导致错误结果。
3. 实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。实验人员必须进行专业培训；实验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染；实验用消耗品（如离心管、移液器吸头等）应有合理的清洁和质检程序；避免污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。
4. 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。
5. 为了避免样本中任何潜在的生物危害，检测样品均应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤，样本的处理应在生物安全柜中操作，操作中废弃物均应按照医疗废弃物进行无害化处理。
6. 操作台、移液器、离心机、耗材等仪器用品应经常用 1.0% 次氯酸钠或稀盐酸擦拭消毒或浸泡。实验房间、超净工作台应定期或每次实验后用紫外灯处理。
7. 手和灰尘是最常见的污染源，所以操作过程一定要带手套，勤换手套，一旦手套接触到样品，立即更换手套。

【标识的解释】



避免日晒



避免雨淋



体外诊断试剂



参考使用说明



向上

【参考文献】

- [1] Busetti M, Longo B, Campello C. Low rates of antimicrobial resistance in respiratory pathogens from a pediatric population in North-eastern Italy[J]. *Pediatr Med Chir*, 2003, 25(2):131-4.
- [2] Lagerstrom F, Bader M, Foldevi M, et al. Microbiological etiology in clinically diagnosed community-acquired pneumonia in primary care in Orebro, Sweden[J]. *Clin Microbiol Infect*. 2003, 9(7):645-52.
- [3] Makela PH. Conjugate vaccines-a breakthrough in vaccine development[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2003, 34(2):249-53.
- [4] Rosinska M, Zielinski A. In process citation[J]. *Przegl Epidemiol*, 2003, 57(1):57-65.
- [5] Russell FM, Buttery J. Vaccine development for capsulate bacteria causing pneumonia [J]. *Curr Opin Pulm Med*, 2003, 9 (3):227-32.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广东和信健康科技有限公司
住所：广州市黄埔区瑞发路1号1栋401房（部位：瑞发路1号自编（1）栋四层001-014房）
邮政编码：510530 电话号码：020-82512529 传真号码：020-82514208-177
售后服务单位：广东和信健康科技有限公司
邮政编码：510530 电话号码：020-82512529 传真号码：020-82514208-177
生产地址：广州市黄埔区瑞发路1号自编（1）栋四层015号房，广州市黄埔区瑞发路1号自编（2）栋四层
生产许可证编号：粤食药监械生产许20193323号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20233401764

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2023年11月28日

修改日期：2023年12月1日