

肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎衣原体核酸检测试剂盒（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、肺炎衣原体核酸检测试剂盒（荧光 PCR 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的肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎衣原体核酸。

肺炎链球菌（Streptococcus pneumoniae, SP）属于链球菌科的链球菌属，革兰氏阳性，有较厚荚膜。肺炎链球菌广泛分布于自然界和人类的上呼吸道、胃肠道、泌尿道及生殖道中，感染后主要引起人类大叶性肺炎，可继发胸膜炎、脓胸，也可引起中耳炎、乳突炎、副鼻窦炎、脑膜炎和败血症等。世界卫生组织统计显示，在引起致命性细菌感染的病原体中，肺炎链球菌位居第 4 位。此外，肺炎链球菌所致的严重肺炎也是发达国家最常见的细菌致死原因之一。

流感嗜血杆菌（Haemophilus Influenzae, HI）是一种没有运动力的革兰氏阴性杆菌。它是于 1892 年由费佛博士在流行性感冒的疫区中发现。流感嗜血杆菌是引起肺炎的主要病原菌之一，也是儿童呼吸道感染的主要病原菌，绝大多数为社区获得性感染。

肺炎衣原体（Chlamydia Pneumoniae, CP）是一种介于病毒和细菌之间的微生物，寄生于细胞内，有细胞膜。主要引起成人及青少年的非典型肺炎，亦可引起支气管炎、咽炎及扁桃体炎等急性呼吸道感染。据统计在引起肺炎的病因中是继肺炎球菌、流感嗜血杆菌之后引起社区获得性肺炎的第三位主要病原体。

本产品适用于下呼吸道感染人群的肺炎链球菌、肺炎衣原体和流感嗜血杆菌病原体感染的辅助诊断，但不应作为患者管理决策的唯一依据。阴性结果不能排除其它呼吸道病原感染。阳性结果不能排除检测指标外细菌感染或其他病毒混合感染情况。

检测过程中，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】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 与 Taqman 探针的技术，针对 SP/HI/CP 的高度保守区设计了特异性引物和荧光探针，实现对疑似感染患者的痰液样本核酸中肺炎链球菌、流感嗜血杆菌和肺炎衣原体的特异性检测。

本试剂盒中 PCR 检测体系含有 UDG 酶加 dUTP 防污染措施，将可能的产物污染充分降解；也含有内源性的内标引物和探针（RNase P 基因），通过检测内标是否正常来监测样本采集、提取过程，避免假阴性结果。

【主要组成成分】

| 序号 | 试剂名称             | 规格与装量<br>(48 人份) | 主要成分                                        |
|----|------------------|------------------|---------------------------------------------|
| 1  | SP/HI/CP-PCR 反应液 | 1248 μL/管×1 管    | 引物、探针、dNTPs、MgCl <sub>2</sub> 、PCR buffer 等 |
| 2  | SP/HI/CP-酶混合液    | 192 μL/管×1 管     | Taq 酶、UDG 酶                                 |
| 3  | SP/HI/CP-阳性对照    | 1000 μL/管×1 管    | 含有靶标 DNA 序列的工程菌和内标 DNA 序列的工程菌               |
| 4  | SP/HI/CP-阴性对照    | 1000 μL/管×1 管    | 生理盐水                                        |

备注：

1) 不同批号产品的组分之间不可以混用或互换；

2) 使用本公司的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20210120 号）进行核酸提取。

【储存条件及有效期】

1.-20±5℃避光保存，有效期 12 个月。

2.试剂盒反复冻融应不超过 5 次。

3.采用泡沫箱加蓄冷剂运输 5 天，保持运输温度不超过 20℃，不会影响产品效期。

4.生产日期，失效日期请见外包装盒。

【适用仪器】

宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

1.适用的样本类型：痰液。

2.样本采集：要求病人深咳后，将咳出的痰液收集于痰液采样管中。检测前，按照说明书中的痰液液化方式进行液化处理。

3.样本保存和运送：经上述处理后的样本 2-8℃保存，可在 72 小时内进行检测；-20±5℃可保存 12 个月；-70℃及以下可保存 12 个月。核酸样本 2-8℃可保存 24 小时，-20±5℃可保存 12 个月。反复冻融不超过 5 次。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1 取出试剂盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温，混匀后备用；

1.2 根据待测样本、阴性对照、阳性对照的数量，按比例（SP/HI/CP-PCR 反应液 26 μL/人份+ SP/HI/CP-酶混合液 4 μL/人份）取相应量的组分，充分混匀成 PCR 混合液，瞬时离心后备用。

2. 样本处理（在样本处理区进行）

2.1 样本液化

2.1.1 向痰液样本中加入 4%氢氧化钠溶液，静置 30min 液化痰液（在液化过程中可震荡加速液化；如痰液粘稠，可适当延长液化时间），待其完全呈液态状态（无明显粘稠物）后，作为待测样本备用；

2.1.2 或使用本公司样本稀释液 Y1001（湘长械备 20221578 号）按照其说明书操作进行痰液液化，处理后的样本作为待测样本备用。

2.2 样本提取

取处理后的 300 μL 待测样本、SP/HI/CP-阴性对照以及 SP/HI/CP-阳性对照加入到 1.5 mL 离心管，使用圣湘生物科技股份有限公司的“核酸提取或纯化试剂”（湘长械备 20210120 号）按其说明书操作进行核酸提取。

3. 加样（在样本处理区进行）

3.1 根据待测样本、阴性对照、阳性对照的数量，每个反应管加入 30 μL PCR 混合液。

3.2 在装有 PCR 混合液的反应管中分别对应加入上述前处理的阴性对照、阳性对照和待测样本（吸打混匀后吸取）各 20 μL，盖上管盖（如有气泡，可用手指弹击去除气泡），瞬时离心或用手轻甩至管壁无明显液珠。

4. PCR 扩增（在扩增与分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

4.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照以及待测样本，并设置样本名称。

4.2 荧光检测通道选择（以宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统为例）：

1) 选择 FAM 通道检测肺炎链球菌；

2) 选择 HEX 通道检测流感嗜血杆菌；

3) 选择 ROX 通道检测肺炎衣原体；

4) 选择 CY5 通道检测内标；

4.3 循环参数设定：

|   | 步骤         | 温度  | 时间    | 循环数 |
|---|------------|-----|-------|-----|
| 1 | UDG 酶反应    | 50℃ | 5 分钟  | 1   |
| 2 | 预变性        | 95℃ | 1 分钟  | 1   |
| 3 | 变性         | 95℃ | 10 秒  | 41  |
| 4 | 退火，延伸及荧光采集 | 60℃ | 20 秒* |     |

（\*注：设置荧光信号采集）

5. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analyze 进行分析，使各项参数符合下述“质量控制”中的要求，然后到 Plate 窗口下记录 Ct 值。

6. 质量控制

6.1 SP/HL/CP-阴性对照：FAM、HEX、ROX 通道无 Ct 值或 Ct 值>40，CY5 通道无 Ct 值或 Ct 值>35。

6.2 SP/HL/CP-阳性对照：FAM、HEX、ROX 和 CY5 通道 Ct 值≤35。

6.3 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【阳性判断值】

通过对临床样本参考值的研究，利用（ROC 曲线法）确定本试剂盒检测目的基因肺炎链球菌、流感嗜血杆菌以及肺炎衣原体的 Ct 参考值为 40，内标基因的 Ct 参考值为 35。

【检验结果的解释】

1.在质量控制结果正常的情况下，参照下表进行结果判读。

阴阳性判读：检测目标靶点 Ct 值≤40，判为阳性；检测目标靶点 Ct 值>40 或无 Ct 值,判为阴性，具体如下：

| FAM 通道<br>（肺炎链球菌） |                    | HEX 通道<br>（流感嗜血杆菌） |                    | ROX 通道<br>（肺炎衣原体） |                    | CY5 通道<br>（内标） |                    |
|-------------------|--------------------|--------------------|--------------------|-------------------|--------------------|----------------|--------------------|
| Ct 值≤40           | No Ct 或<br>Ct 值>40 | Ct 值≤40            | No Ct 或<br>Ct 值>40 | Ct 值≤40           | No Ct 或<br>Ct 值>40 | Ct 值≤35        | No Ct 或<br>Ct 值>35 |
| 阳性                | 阴性                 | 阳性                 | 阴性                 | 阳性                | 阴性                 | 阳性             | 阴性                 |

2.对于阳性样本，内标检测结果不做要求；对于阴性样本，其内标检测应为阳性，若其内标阴性（Ct 值>35 或无 Ct 值），则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本重新采样，进行重复实验（若重复试验的检测结果仍无效，请与本公司联系）。

3.对于非人源性样本，阴性样本检测内标为阴性，属结果正常，无需复测。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测结果应结合患者临床症状及其他相关医学检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据，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. 检验的痰液样本核酸出现序列变异时会存在假阴性风险。
3. 不合理的样本采集、转运及处理以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
4. 本试剂盒对于肺炎链球菌、流感嗜血杆菌或肺炎衣原体感染不同病程不同阶段样本的阳性率不一致。
5. 待检核酸序列可能长时间出现在体内，而与肺炎链球菌、流感嗜血杆菌或肺炎衣原体活性无关。核酸检测阳性并不意味着目前感染了相应肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、肺炎衣原体或其为临床症状的致病因子。
6. 样本处理过程出现交叉污染，会造成假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 准确性：本试剂盒检测阳性企业参考品，阳性符合率均为 100%；
2. 精密度：批内/批间、日内/日间批间检测 Ct 值的变异系数（CV%）≤5.0%。
3. 样本中可能存在的干扰物质：100 µg/mL 盐酸羟甲唑啉、50 µg/mL 地塞米松、50 µg/mL 盐酸头孢甲氧、100 µg/mL 奥司他韦、100 µg/mL 扎那米韦、100 µg/mL 利巴韦林、100 µg/mL 阿奇霉素、300 U/mL α-干扰素、320 µg/mL 布地奈德、125 µg/mL 苯福林、100 µg/mL 妥布霉素、50 µg/mL 倍氯美松、100 µg/mL 氟尼缩松、100 µg/mL 莫米松、200 µg/mL 氟替卡松、200 µg/mL 盐酸组胺、100 µg/mL 帕拉米韦、100 µg/mL 洛匹那韦、100 µg/mL 莫匹罗星、100 µg/mL 曲安奈德、100 µg/mL 利托那韦、100 µg/mL 阿比多尔、60 µg/mL 氯化钠、100 µg/mL 尿素、10 µg/mL 血红素、20 µg/mL 纯化粘蛋白、2%(v/v)无水乙醇、5%(v/v)人全血、100µg/mL 苯佐卡因、130µg/mL 薄荷脑、500 copies/mL 鼻内活流感病毒对试剂盒的检测结果显示无明显干扰。

4. 最低检测限：本试剂盒最低检测限为 200 copies/mL。

5. 特异性：检测企业阴性参考品，阴性符合率 100%；本试剂盒与大肠埃希菌、肠病毒 A、B 型，肠病毒 C 型（EV-C95），肠病毒 D 型（EV-D70），偏肺病毒、人间质肺病毒、新生隐球菌、化脓性链球菌、鲍曼不动杆菌、肺孢子菌、肺炎克雷伯杆菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌、百日咳杆菌、金黄色葡萄球菌、EB 病毒、人巨细胞病毒、烟曲霉、白色念珠菌、光滑念珠菌、结核分枝杆菌、非结核分枝杆菌、诺如病毒、轮状病毒、水痘-带状疱疹病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、人类基因组 DNA、博卡病毒、肺炎支原体、单纯疱疹病毒 1 型、奈瑟氏菌属、表皮葡萄球菌、棒状杆菌属、啐液链球菌、乳酸杆菌属、卡他莫拉菌等阳性样本无交叉反应。

6. 临床试验结果：在 7 家临床单位完成 815 例样本的临床试验，考核试剂与已批准上市的同类试剂相比，肺炎链球菌的阳性符合率为 98.1%，阴性符合率为 98.4%，总符合率为 98.3%；流感嗜血杆菌的阳性符合率为 98.0%，阴性符合率为 98.1%，总符合率为 98.0%；肺炎衣原体的阳性符合率为 98.8%，阴性符合率为 98.4%，总符合率为 98.5%。考核试剂与病原菌分离培养鉴定对比研究的样本例数为 683 例，研究结果统计为肺炎链球菌的灵敏度为 100.0%，特异性为 85.0%，准确度为 88.3%；流感嗜血杆菌的灵敏度为 100.0%，特异性为 85.2%，准确度为 89.3%。

【注意事项】

1. 该产品仅供体外诊断使用。在开始测定之前，请仔细阅读并完全理解整个说明书。请严格按照说明进行操作，否则对本协议的任何替代或更改都可能导致无效结果。
  2. 实验前请熟悉和掌握需使用仪器的操作方法和注意事项，实验操作人员应接受过培训。
  3. 所有检测样品应视为具有传染性物质，废弃处理时，按照当地政府和国家有关规定进行。
  4. 提示：试剂保存、运输及使用过程中操作不当均可能影响其检测结果，请严格按照说明书规定操作。
- 因痰液样本采集过程及细菌性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] Zhang C, Chen X, Wang L, et al. Evaluation of a multiplex PCR kit for detection of 17 respiratory pathogens in hospitalized patients[J].J Thorac Dis, 2022, 9(14):3386-3397.
- [2] European Centre for Disease Prevention and Control: Antimicrobial resistance surveillance in Europe 2011.
- [3] Jones M C, Macgillivray S, Kroll T, et al. Moraxella catarrhalis Infections[J].Journal of Nursing & Healthcare of Chronic Illness, 2011, 3(3):174-185.
- [4] Tenover FC. Developing molecular amplification methods for rapid diagnosis of respiratory tract infections caused by bacterial pathogens.Clin Infect Dis 2011; 52 (suppl 4): S338-45.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：圣湘生物科技股份有限公司

住所：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

联系方式：0731-88883176

售后服务单位名称：圣湘生物科技股份有限公司

联系方式：0731-88883176

生产地址：长沙市岳麓区麓松路 682 号主厂房 101

生产许可证编号：湘药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20253401714

【说明书核准日期及修改日期】2025 年 08 月 25 日