

六项呼吸道病原菌核酸检测试剂盒（多重荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】
通用名称：六项呼吸道病原菌核酸检测试剂盒(多重荧光 PCR 法)
【包装规格】24 人份/盒
【预期用途】

本试剂盒体外定性检测人痰液中临床常见下呼吸道病原菌，包括肺炎克雷伯杆菌、肺炎链球菌、荚膜型流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌和金黄色葡萄球菌。

检测结果可用于呼吸道疑似细菌感染的住院病人或重症病人的辅助诊断，检测结果不直接用于指导抗生素的使用。临床诊断应结合病原体培养鉴定。

呼吸道感染分为上呼吸道感染与下呼吸道感染，其中下呼吸道感染是患者门诊就诊最常见的病因，大部分的下呼吸道感染是由细菌感染导致，细菌感染或继发感染经常引起呼吸道疾病症状的加重，如不能及时准确地明确病原体种类，并针对性用药，将会延误疾病的最佳治疗时间，然而目前传统的诊疗手段主要为生化指标的鉴定、病原体培养等，方法操作准确性不够、周期长，很难给医生提供精准的辅助诊断，进而使得大部分的用药仍处于经验性用药阶段，不仅加快了细菌产生耐药的周期，也影响了患者的及时诊断。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒是基于 Taq 酶水解荧光探针产生荧光信号及带荧光产物杂交产生荧光信号的两种技术原理，针对单色荧光通道中一个目标靶点的检测采用荧光探针，另一个目标靶点的检测采用熔解曲线的方式，从而实现在单色荧光通道中同时进行两个目标靶点的检测和分析。试剂盒针对检测细菌核酸保守区设计的特异性引物、特异荧光探针，配以 PCR 反应液等组分，在荧光定量 PCR 仪上，应用多重实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现对待测样本中下呼吸道病原菌核酸的快速检测。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），通过检测待测样本中编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)管家基因的 DNA 是否正常，进而来监测待测样本的提取过程和 PCR 扩增过程，避免假阴性结果。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下组分组成：

序号	组成	规格与装量	主要成分
1	下呼六-PCR反应液	1056μL管×1管	引物，探针，dNTPs，PCR buffer 等
2	下呼六-酶混合液	24μL/管×1管	Taq酶,UDG酶
3	下呼六-阳性对照	1000μL/管×1管	质粒
4	下呼六-阴性对照	1000μL/管×1管	生理盐水

备注：

- 1) 推荐使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）进行核酸提取。
- 2) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。
- 3) 试剂盒内的生物样本均已经灭活处理。
- 4) 自备试验器材：无 DNA 酶、RNA 酶的 1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、吸嘴（建议使用带滤芯吸嘴，规格：10μL、200μL、1000μL）；离心机；振荡混合器；（磁珠）分离器；各种规格的加样枪。

【储存条件及有效期】

- 1.试剂盒置于-20±5℃保存，有效期为 12 个月。
- 2.试剂应避免光密闭，生产日期，失效日期请见外包装盒。不使用时，这些试剂在包装标识的效期内可稳定存放。一旦使用，反复冻融应不超过 3 次，每周开封 1 次，可连续检测 3 次。

【适用仪器】

适用于宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：痰液。
2. 样本采集：用无菌容器采集患者的痰液，痰液经生理盐水或 4%NaOH 液化后样本量应不少于 1mL。
3. 样本保存和运送：待测样本可在 2℃～8℃放置 72 小时，在≤-20℃条件下可放置 3 年，避免反复冻融。

【检验方法】

一．试剂准备（在试剂准备区进行）

- （一）取出包装盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，震荡混匀，瞬时离心后备用；
- （二）根据待测样本、阳性对照、阴性对照的数量，按比例（下呼六-PCR 反应液 44μL/人份+下呼六-酶混合液 1μL/人份）取相应量的下呼六-PCR 反应液和下呼六-酶混合液，充分混匀成 PCR 混合液，2000rpm 离心 10s 后备用。

二、样本处理与加样（在样本处理区进行）（下呼六-阴性对照、下呼六-阳性对照与待测样本同步处理）

（一）样本前处理

往样本收集管中加入等体积生理盐水或 4%NaOH，充分液化，然后把全部液体倒入 1.5mL 离心管中，作为待测样本备用。

（二）样本处理

取 200μL 待测样本、下呼六-阳性对照、下呼六-阴性对照到 1.5mL 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 20150021 号）按其说明书操作进行核酸提取。

（三）加样

- 1 吸取上述处理好的样本、下呼六-阳性对照及下呼六-阴性对照各 5μL 分别加入对应的 0.2mL PCR 反应管中，每管加入 45μL PCR 混合液，盖上管盖；
- 2 建议采用如表 1 所示的布板方式点样上机检测。

表 1 建议的点样布板示意图（96 孔板）

阳性对照	样本 7										
阴性对照	样本 8										
样本 1	样本 9										
样本 2	...										
样本 3											
样本 4											
样本 5											
样本 6											

三、PCR 扩增（请参照各仪器使用说明书进行设置）

（一）将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阳性对照、阴性对照及待测样本，并设置样本名称。

（二）荧光检测通道选择：

1.选择 FAM 通道检测肺炎克雷伯杆菌和嗜肺军团菌；2）选择 HEX 通道检测肺炎链球菌和内标；3）选择 ROX 通道检测流感嗜血杆菌；4）选择 CY5 通道检测铜绿假单胞菌和金黄色葡萄球菌。

（三）循环参数设定：

步骤		温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	94℃	3 分钟	1
3	变性	94℃	10 秒	45
4	退火	60℃	20 秒	
5	延伸及荧光检测	75℃	20 秒*	
6	熔解曲线	62-75℃#	全过程采集荧光*	1

注：在宏石荧光 PCR 仪上熔解曲线温度为 62-75℃，在 Quant Studio 5 荧光 PCR 仪上由于软件无法改动温度，应用默认的 60-90℃。

四、结果分析（请参照宏石 SLAN-96P 仪器使用说明书进行设置）

（一）目标靶点检测信号为 FAM，HEX（或 VIC），ROX，以及 CY5 通道，内标检测信号为 HEX 通道的熔解曲线；

（二）Baseline 的设置：Baseline 一般设置为 3-15 个循环，具体可根据实际情况进行调整。其调整原则为：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 减少 1-2 个循环。Threshold 的设置：设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。

（三）结果阴阳性判定：先分析内标在 HEX 通道是否检测到熔解曲线特征峰，且 Tm 在 65.8~68.5℃之间，若有，表示本次检测有效，可继续进行后续分析：

1.若 FAM 通道检测到典型的 S 型扩增曲线，且 Ct≤39，表示肺炎克雷伯杆菌检测结果为阳性，若 Ct>39 或无 Ct，则为阴性；若 FAM 通道检测到 Tm（68.8~71.3℃）特征峰，表示嗜肺军团菌检测结果为阳性，若无熔解曲线特征峰或 Tm 不在 68.8~71.3℃之间，则为阴性；

2.若 HEX 通道检测到典型的 S 型扩增曲线，且 Ct≤39，表示肺炎链球菌检测结果为阳性，若 Ct>39 或无 Ct，则

为阴性；

3.若 ROX 通道检测到典型的 S 型扩增曲线，且 Ct≤39，表示流感嗜血杆菌检测结果为阳性，若 Ct>39 或无 Ct，则为阴性；

4.若 CY5 通道检测到典型的 S 型扩增曲线，且 Ct≤39，表示铜绿假单胞菌检测结果为阳性，若 Ct>39 或无 Ct，则为阴性；若 CY5 通道检测到 Tm（66.8~70.0℃）特征峰，表示金黄色葡萄球菌检测结果为阳性，若无熔解曲线特征峰或 Tm 不在 66.8~70.0℃之间，则为阴性；

5.若内标在 HEX 通道没有检测到 Tm（65.8~68.5℃）特征峰，表示本次检测样本浓度太低或者有干扰物质抑制反应，需重新准备实验。

表 2 阴阳性判定方法

FAM 通道	HEX 通道	ROX 通道	CY5 通道	结果判断
扩增曲线 Ct≤39；	/	/	/	肺炎克雷伯杆菌阳性
熔解曲线特征峰 68.8~71.3℃	/	/	/	嗜肺军团菌阳性
/	扩增曲线 Ct≤39；	/	/	肺炎链球菌阳性
/	/	扩增曲线 Ct≤39	/	流感嗜血杆菌阳性
/	/	/	扩增曲线 Ct≤39	铜绿假单胞菌阳性
/	/	/	熔解曲线特征峰 66.8~70.0℃	金黄色葡萄球菌阳性

五、质量控制

（一）下呼六-阴性对照：检测靶标均为阴性，即 FAM、HEX、ROX、CY5 通道中应无熔解曲线，以及无扩增曲线(No Ct)或 Ct 值>39；

（二）下呼六-阳性对照：阳性对照应检测 FAM、HEX、ROX、CY5 通道均有明显 S 型扩增曲线，且检测 Ct 值≤33；且在三个通道中均有熔解曲线特征峰，Tm 分别为 FAM(68.8~71.3℃)，HEX（65.8~68.5℃），CY5（66.8~70.0℃）。

（三）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】

根据临床研究实验数据绘制 ROC 曲线，通过参考值的研究，确定本试剂盒用扩增曲线检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 39，用熔解曲线来检测目标基因的 Tm 阳性判断值为 FAM(68.8~71.3℃)，HEX（65.8~68.5℃），CY5（66.8~70.0℃）。

【检验结果的解释】

1. 对于阳性样本及细菌培养物，内标检测结果不作要求；对于阴性样本（六种呼吸道病原菌均未检出），其内标检测应为阳性，若其内标检测为阴性，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）。

【检验方法的局限性】

样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。本试剂盒检测是针对病原菌的保守区，极少发生突变，但不排除病原体在流行过程中的基因突变可能导致假阴性结果。

本试剂盒仅用于痰液提取的核酸检测，检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其病史、症状以及其他实验室检查等情况综合考虑。

本试剂盒检测对象仅包括呼吸道肺炎克雷伯杆菌，肺炎链球菌，流感嗜血杆菌，铜绿假单胞菌，嗜肺军团菌，金黄色葡萄球菌等，并未涵盖与呼吸道感染相关的全部细菌，因此，报告的呼吸道病原菌种仅限于本试剂盒所检测的菌种，检测结果阴性不代表样本未含有其他病原体。

【产品性能指标】

阴阳性符合率：本试剂盒检测企业参考品，阴、阳性符合率均为 100%。

最低检测限：本试剂盒对各病原菌企业参考品最低检测限分别为肺炎克雷伯菌 900 CFU/mL、肺炎链球菌 15 CFU/mL、流感嗜血杆菌 625 CFU/mL、铜绿假单胞菌 675 CFU/mL、嗜肺军团菌 340 CFU/mL、金黄色葡萄球菌 2875 CFU/mL。

精密性：精密度度试验表明批间、日间、不同操作者间及不同房间检测重复性好，同一份样本平行检测结果 Ct 值的变异系数（CV，%）应≤5%，熔解曲线检测结果应一致，均为阳性。

特异性：本试剂盒涵盖的各呼吸道病原菌之间无交叉反应；与常见呼吸道病原体（溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、粘质沙雷氏菌、嗜麦芽窄食单胞菌、粪肠球菌、白色念珠菌、产酸克雷伯菌、化脓链球菌、滕黄微球菌、马红球菌、格氏李斯特菌、琼氏不动杆菌、副流感嗜血杆菌、杜莫夫军团菌、产气肠杆菌、溶血嗜血杆菌、嗜麦芽糖寡痒单胞菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、唾液链球菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、黄曲霉菌、土曲霉菌、烟曲霉菌、光滑念珠菌、热带念珠菌阳性样本）无交叉反应。

抗干扰能力：干扰物质参考品检测表明，常见的治疗呼吸道感染的药物（如美罗培南、亚胺培南、头孢哌酮舒巴坦、莫西沙星、阿米卡星、利奈唑胺、万古霉素等）在正常的使用剂量浓度下对本试剂无干扰。

临床性能：两次临床研究共检测样本 2047 例，首次临床 1548 例，总体样本阳性一致性百分比为 99.88%（95% CI: 99.31%~100.00%），阴性一致性百分比为 97.72%（95% CI: 96.37%~98.66%），总一致性百分比为 98.84%（95% CI: 98.17%~99.31%）；同时每种病原体进行了待考评试剂与病原体分离培养鉴定方法的比较研究，灵敏度为 100.00%（95% CI: 99.32%~100.00%），特异度为 72.22%（95% CI: 69.35%~74.97%），总符合率为 81.91%（95% CI: 79.90%~83.80%）；增补临床试验 499 例，总体样本：阳性一致性百分比为 100%（95% CI: 99.09%~100%），阴性一致性百分比为 79.79%（95% CI: 70.25%~87.37%），总一致性百分比为 96.19%（95% CI: 94.12%~97.69%）。通过此次临床研究表明：圣湘公司开发的六项呼吸道病原菌核酸检测试剂盒（多重 PCR 荧光法）与金标准核酸序列测定对照方法检测结果具有很好的一致性，与已上市同类产品对照试剂检测结果具有很好的一致性，与病原体分离培养鉴定符合率高，并且操作简单，符合临床检测要求，具有较高的临床应用价值。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所用消耗品应洁净，且一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
4. 操作待检样本时应注意防护，实验过程中穿工作服，戴一次性口罩及手套并经常替换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
5. 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。
6. 试剂盒采用泡沫箱加蓄冷剂的方式运输 5 天，温度不高于 20℃不会影响产品效期。

【参考文献】

- [1] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京：人民军医出版社, 2007:63-65.
- [2] Huang Q, Liu Z, Liao Y, et al. Multiplex Fluorescence Melting Curve Analysis for Mutation Detection with Dual-Labeled, Self-Quenched Probes. PLoS ONE (2011), 6(4): e19206.
- [3] 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 传真号码：0731-88884876
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 传真号码：0731-88884876
生产地址：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号
生产许可证编号：湘食药监械生产许 20150036 号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223400597
【说明书核准日期及修改日期】2022 年 05 月 09 日
生产日期：请见外包装盒
失效日期：请见外包装盒