

受理号：CSZ2000253

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：六项呼吸道病原菌核酸检测试剂盒
(多重荧光 PCR 法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：圣湘生物科技股份有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要.....	5
三、 临床评价摘要.....	11
四、 风险分析及说明书提示.....	14
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

圣湘生物科技股份有限公司

二、申请人住所

长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

三、生产地址

长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品试剂盒由以下组分组成，主要组成成分见表1。

表1 试剂盒主要组成成分

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

其他内容详见产品说明书

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于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。

(三) 产品包装规格

24人份/盒

(四) 产品检验原理

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。试剂盒针对待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在待测样本中下呼吸道感染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。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1.主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：引物、探针、dNTPs、热启动Taq酶、UDG酶、质粒。这些原材料均为外购方式获得。

引物、探针为申请人自行设计后由专业合成公司合成。申请人选择有资质的供应商提供的原料，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

2.企业参考品和质控品设置情况

企业参考品采用真实样本制备而成，包括阳性参考品（PC1~PC12）、阴性参考品（NC1~NC8）、检测限参考品（LC1-LC6）以及精密度参考品（RC1~RC2）。

阳性参考品（PC1~PC12）由经过灭活处理后不同浓度的12份六项呼吸道病原菌阳性样品组成，其中PC1、PC2肺炎链球菌阳性，其余病原菌阴性；PC3、PC4肺炎克雷伯杆菌阳性，其余病原菌阴性；PC5、PC6流感嗜血杆菌阳性，其余病原菌阴性；PC7、PC8金黄色葡萄球菌阳性，其余病原菌阴性；PC9、PC10铜绿假单胞菌阳性，其余病原菌阴性；PC11、PC12嗜肺军团菌阳性，其余病原菌阴性。

阴性参考品NC1~NC6为种属相近的或引起症状相似的病原菌，分别为溶血葡萄球菌、表皮葡萄球菌、鲍曼不动杆菌、大肠埃希菌、粘质沙雷氏菌、嗜麦芽窄食单胞菌阳性样本，NC7，NC8为正常人痰液样本。

检测限参考品LC1~LC6为试剂盒覆盖的6种阳性病原菌，其中LC1为肺炎克雷伯杆菌、LC2为肺炎链球菌、LC3为流感嗜血杆菌、LC4金黄色葡萄球菌、LC5为铜绿假单胞菌、LC6嗜肺军团菌。

精密度参考品RC1~RC2为试剂盒覆盖的6种阳性病原菌混合样品。

试剂盒包含阳性对照品和阴性对照品各1支，用于检测过程的质量控制。阳性对照品为添加有内标基因和目标病原

菌基因的混合质粒样本，覆盖试剂盒可检出的所有目标病原菌，阴性对照品为生理盐水。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。申请人对样本中可能存在的抑制因素进行了测试，以及对样本核酸提取方法、取样量、上机用量进行了研究；同时对引物、探针、Taq酶、UDG酶、dNTPs、Mg离子等的浓度和体积进行了优化；并对反应条件进行优化，包括痰液液化方法选择、UDG酶处理时间、变性时间、退火和延伸温度、循环数的选择以及适用仪器类型的研究，并通过验证最终确定了最佳反应体系。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能评估内容主要包括：核酸提取性能、准确度、精密度、最低检测限、特异性、包容性、携带污染验证、竞争性干扰研究等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品，在适用机型SLAN-96P全自动医用PCR分析系统、Life Technologies QuantStudio™ 5荧光PCR仪上的性能评估资料。

在核酸提取效率中，比较评估了产品配套使用的核酸提取试剂盒的提取效果，结果表明配套使用的核酸提取试剂盒的核酸提取效率满足产品使用需求。

在准确度中，申请人采用三批成品试剂盒，检测企业阳

性参考品和阴性参考品，以及临床样本与国家参考品。结果表明阳性符合率和阴性符合率均为100%。

在精密度研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对阴性和两个不同浓度的3份混合临床样本，进行了连续21天的重复性检测，评估了批内/批间、日内/日间、不同地点、不同操作者之间的精密度。结果表明：试剂盒批内/批间、日内/日间、不同地点、不同操作者之间均有着很好的检测重复性，精密度好。

在最低检出限研究中，申请人采用三批成品试剂盒，检测系列浓度梯度样本，研究样本包含目标菌的常见型别，将达到95%阳性检出率的最低浓度水平作为确定的最低检出限，并进行最低检测限验证。最终确定该产品各靶标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。

在包容性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对收集不同地区的各目标菌的阳性样本及不同型别病原体进行检测。包括肺炎克雷伯菌肺炎亚种、鼻硬结亚种、[KPC]耐药型、臭鼻亚种，肺炎链球菌1型、6B型、14型、2型、3型，流感嗜血杆菌A型、B型、C型，铜绿假单胞菌黏液型、非黏液型，嗜肺军团菌1型、2型、3型、4型、6型，金黄色葡萄球菌金黄亚种、MRSA。检测结果表明，本试剂检测不同地

区收集的肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、铜绿假单胞菌、嗜肺军团菌、金黄色葡萄球菌及不同型别的病原体均能正确检出，说明试剂盒有较好的包容性。

在特异性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，进行了近源菌及不在试剂盒检测范围中的呼吸道感染相关病原体的交叉反应。结果表明：本试剂盒与溶血葡萄球菌、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、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、热带念珠菌无交叉反应。

在干扰性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，进行了在内源/外源干扰物质研究及竞争性干扰研究，对样本中可能含有的干扰物质分别进行评价，包括100 μ g/mL美罗培南、100 μ g/mL亚胺培南、100 μ g/mL头孢哌酮舒巴坦、100 μ g/mL莫西沙星、100 μ g/mL阿米卡星、100 μ g/mL利奈唑胺、100 μ g/mL万古霉素、60 μ g/mL氯化钠、20%(v/v)无水乙醇、10 μ g/mL EDTA、20%(v/v)人全血、20 μ g/mL纯化粘蛋白、10 μ g/mL血红素等，结果显示内外源干扰物质不会对产品检

测结果产生干扰。同时在竞争性干扰研究中，当一种病原体在最低检测限浓度附近，其他病原体为高浓度时，各靶标之间不会产生竞争干扰。故试剂盒检测结果不受内源/外源干扰物质及竞争性干扰影响。

(四) 阳性判断值

申请人对收集的临床样本进行检测，获得原始的Ct值和Tm值用于制定各指标的阳性判断值。对于含有阳性和阴性数据的指标，采用ROC曲线法制定各指标的阳性判断值。并进行了阳性判断值的验证，根据验证结果最终确定了试剂盒的阳性判断值见表2。

表2阳性判断值

检测指标	阳性判断值 (Ct/Tm)
肺炎克雷伯杆菌	39
肺炎链球菌	39
流感嗜血杆菌	39
铜绿假单胞菌	39
金黄色葡萄球菌	66.8℃~70.0℃
嗜肺军团菌	68.8℃~71.3℃
内标	65.8℃~68.5℃

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开瓶稳定性、反复冻融稳定性以及样本稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品及其样本的有效保存时间。

实时稳定性：试剂盒储存于-20℃ ± 5℃。分别于不同时

间点领取完整包装的试剂盒，对其外观、阴阳性符合率、最低检测限和精密度进行考察。结果表明试剂盒在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，本试剂盒有效期为12个月。

开瓶稳定性及反复冻融稳定性：申请人对成品试剂盒按照规定储存温度进行储存，试剂盒冻结后再取出置于室温解冻，如此反复冻融数次。将冻融后的产品在不同时间点进行外观、阴阳性符合率、最低检测限、精密度的考察。结果表明，试剂开封后不影响试剂盒有效期，使用过程中尽量避免反复冻融，冻融次数不超过3次。

申请人对样本和核酸保存稳定性及冻融次数进行了研究。结果表明：适用于本试剂的样本和核酸在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不得超过72小时， -20°C 保存不得超过36个月， -70°C 保存不得超过36个月；样本尽量避免反复冻融，冻融次数不超过4次。

三、临床评价概述

申请人在湖南省人民医院、湖南省儿童医院、江西省儿童医院、武汉市传染病医院共四家临床机构完成了临床试验。

临床试验主要包括三部分内容：

第一部分，采用试验用体外诊断试剂与病原体核酸测序方法进行比对。共计入组1548例具有下呼吸道症状或体征或疑似相关病原体感染的病例，其中肺炎克雷伯杆菌，对照方法检测阳性病例233例，对照方法检测阴性病例1315例，试

试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率99.57%（95%CI:97.63%~99.99%），阴性符合率99.39%（95%CI:98.81%~99.74%）；肺炎链球菌，对照方法检测阳性病例262例，对照方法检测阴性病例1280例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100.00%（95%CI:98.60%~100.00%），阴性符合率99.53%（95%CI:98.99%~99.83%）；流感嗜血杆菌，对照方法检测阳性病例206例，对照方法检测阴性病例1342例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率99.51%（95%CI:97.33%~99.99%），阴性符合率99.33%（95%CI:98.73%~99.69%）；铜绿假单胞菌，对照方法检测阳性病例163例，对照方法检测阴性病例1385例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100.00%（95%CI:97.76%~100.00%），阴性符合率99.64%（95%CI:99.16%~99.88%）；金黄色葡萄球菌，对照方法检测阳性病例172例，对照方法检测阴性病例1376例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率99.42%（95%CI:96.80%~99.99%），阴性符合率99.64%（95%CI:99.15%~99.88%）；嗜肺军团菌，对照方法检测阳性病例5例，对照方法检测阴性病例1543例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100.00%（95%CI:47.82%~100.00%），阴性符合率99.87%（95%CI:99.53%~99.98%）。

第二部分，为进一步验证试验用体外诊断试剂临床性能，

采用试验用体外诊断试剂与已上市同类产品进行比对，已上市同类产品选择博奥晶芯生物科技有限公司生产的呼吸道病原菌核酸检测试剂盒（恒温扩增芯片法），上海之江生物科技股份有限公司生产的嗜肺军团菌核酸检测试剂盒（荧光PCR法）。共计入组499例具有下呼吸道症状或体征或疑似相关病原体感染的病例，其中肺炎克雷伯杆菌，对已上市同类产品检测阳性病例78例，已上市同类产品检测阴性病例421例，试验体外诊断试剂与已上市同类产品对比，阳性一致率100%（95% CI: 95.38%~100%），阴性符合率99.29%（95% CI: 97.93%~99.85%）；肺炎链球菌，已上市同类产品检测阳性病例79例，已上市同类产品检测阴性病例420例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100%（95% CI: 95.44%~100%），阴性符合率98.81%（95% CI: 97.24%~99.61%）；流感嗜血杆菌，已上市同类产品检测阳性病例86例，已上市同类产品检测阴性病例413例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100%（95% CI: 95.80%~100%），阴性符合率99.27%（95% CI: 97.89%~99.85%）；铜绿假单胞菌，已上市同类产品检测阳性病例78例，已上市同类产品检测阴性病例421例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100.00%（95% CI: 95.38%~100.00%），阴性符合率98.81%（95% CI: 97.25%~99.61%）；金黄色葡萄球菌，已上市同类产品检测

阳性病例72例，已上市同类产品检测阴性病例427例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100%（95% CI：95.01%~100%），阴性符合率99.30%（95% CI：97.96%~99.85%）；嗜肺军团菌，已上市同类产品检测阳性病例60例，已上市同类产品检测阴性病例439例，试验体外诊断试剂与测序法对比，阳性一致率100.00%（95% CI：94.04%~100.00%），阴性符合率100%（95% CI：99.16%~100%）。

第三部分，临床试验统计了部分入组病例的病原体分离培养信息，对试验体外诊断试剂检测结果与病原体分离培养结果进行了比对分析，结果显一致性良好。

综上所述，该产品临床试验试剂符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求。临床试验结果显示该产品与病原体核酸测序、已上市同类产品及病原体分离培养结果一致性较好。

四、产品收益风险判定

根据申请人提供的申报资料，经综合评价，在目前认知水平上，认为该产品的上市为适用人群带来的受益大于风险。但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在说明书中提示以下信息：

- 1.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。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。

2.警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第739号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（原国家食品药品监督管理总局令2014年第5号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。

2022年4月28日

附件：产品说明书

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、病原体的培养等，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。试剂盒针对待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 200 μ L 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 5 μ L 分别加入对应的 0.2mL PCR 反应管中，每管加入 45 μ L 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 $^{\circ}$ C	2 分钟	1
2	预变性 94 $^{\circ}$ C	3 分钟	1
3	变性 94 $^{\circ}$ C	10 秒	45
4	退火 60 $^{\circ}$ C	20 秒	
5	延伸及荧光检测 75 $^{\circ}$ C	20 秒*	1
6	熔解曲线 62-75 $^{\circ}$ C#	全过程采集荧光*	

注：在宏石荧光 PCR 仪上熔解曲线温度为 62-75 $^{\circ}$ C，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 $^{\circ}$ C。

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 $^{\circ}$ C 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 \leq 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 $^{\circ}$ C) 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 $^{\circ}$ C 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 \leq 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 \leq 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；

(四) 若 CY5 通道检测到典型的 S 型扩增曲线，且 Ct \leq 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 $^{\circ}$ C) 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 $^{\circ}$ C 之间，则为阴性；

4. 若内标在 HEX 通道没有检测到 Tm (65.8~68.5 $^{\circ}$ C) 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 \leq 39;	/	/	/	肺炎克雷伯杆菌阳性
熔解曲线特征峰 68.8~71.3 $^{\circ}$ C	/	/	/	嗜肺军团菌阳性
/	扩增曲线 Ct \leq 39;	/	/	肺炎链球菌阳性
/	/	扩增曲线 Ct \leq 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】

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、膝黄微球菌、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、嗜麦芽糖寡杆菌、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： 传真号码：

售后服务单位名称：

联系方式： 传真号码：

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：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】