

沙眼衣原体、肺炎衣原体和肺炎支原体核酸检测试剂盒

（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称: 沙眼衣原体、肺炎衣原体和肺炎支原体核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

16 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于婴幼儿痰液样本中沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*, CT）、肺炎衣原体（*Chlanlydia pneumoniae*, CP）和肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*, MP）核酸的定性检测。

本试剂盒可用于呼吸道感染的临床辅助诊断。肺炎衣原体属严格的人类病原体，目前只有一种血清型，机体针对肺炎衣原体的感染免疫力弱，易形成持续感染和反复感染，且人群普遍易感，其感染可引起呼吸系统疾病，如肺炎、咽炎、喉炎、支气管炎等。肺炎支原体通常导致轻微的上呼吸道感染，如咽喉炎和气管炎等，但可引起肺外并发症，累及一个或多个系统、器官，如皮肤、胃肠道、心血管、骨骼肌肉和肾脏，严重可致中枢和外周神经系统病变，甚至死亡，通过飞沫以气溶胶形式传播，存留在鼻、喉、气管和痰液中，密切接触可引起肺炎支原体的暴发。沙眼衣原体引起多种疾病，如沙眼，人类泌尿生殖道疾病，还可以通过母婴传播新生儿眼结膜炎、肺炎，并可导致胎膜早破、早产、新生儿死亡等，也是导致婴儿下呼吸道感染及黄疸的主要原因之一。临床或实验室诊断肺炎支原体、肺炎衣原体和沙眼衣原体的检测方法有酶联免疫法和分离培养法等。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】

本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 荧光探针技术对人痰液样本中沙眼衣原体、肺炎衣原体和肺炎支原体核酸进行定性检测。针对沙眼衣原体的质粒进行引物探针设计，探针采用 FAM 荧光标记；针对肺炎衣原体的主要外膜蛋白编码基因（major outer membrane protein (MOMP) gene）设计引物探针，探针采用 ROX 荧光标记；针对肺炎支原体的 P1 基因来设计引物探针，探针采用 VIC 荧光标记。人工合成一段序列作为试剂盒内标，该序列与已知物种的核苷酸序列无相似性，内标探针采用 CY5 荧光标记。强阳性质控品和弱阳性质控品包含有沙眼衣原体、肺炎衣原体和肺炎支原体的基因序列，是合成的重组质粒。

【主要组成成分】

沙眼衣原体、肺炎衣原体和肺炎支原体核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）（16 人份/盒）包括以下组分：

序号	标签	成份	数量 （16 人份/盒）
1	缓冲液	含镁离子、钾离子、dNTPs、Tris 等	1 管（120μL/管）
2	引物探针	含沙眼衣原体、肺炎衣原体、肺炎支原体和内标检测引物、探针等	1 管（40μL/管）
3	酶	含 DNA 聚合酶和尿嘧啶糖基化酶	1 管（10μL/管）
4	强阳性质控品	含沙眼衣原体、肺炎衣原体、肺炎支原体目的基因	1 管（500μL /管）
5	弱阳性质控品	含沙眼衣原体、肺炎衣原体、肺炎支原体目的基因	1 管（500μL /管）
6	内标	含内标基因	1 管（200μL /管）
7	水	水	1 管（1mL /管）

备注：

1. 本试剂盒可配套使用的核酸抽提试剂盒包括西安天隆生物科技有限公司生产的核酸提取试剂盒(磁珠法)，注册号是陕西食药监械(准)字 2011 第 1400125 号。

【储存条件及有效期】

-20℃避光密闭保存，有效期为 12 个月。

采用泡沫盒加干冰或冰袋密封进行运输。试剂盒在 4℃避光条件下暂存时间不宜超过 6 天（超过 6 天效果未验证）；反复冻融超过 6 次效果未验证；开瓶情况下，在 4℃可存放 6 天，第 7 天内标 Ct 升高，目的基因检测效果不变，超过 7 天效果未验证。开封后，请避光密闭保存于-20℃，生产日期或失效日期见试剂盒外标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 Stratagene MX 3000P、ABI 7500 和 BioRad CFX96 实时荧光定量 PCR 仪, 适用于西安天隆生物科技有限公司的 NP968 核酸自动纯化仪。

【样本要求】

样本采集的对象是肺炎支原体感染如支原体肺炎、支气管炎、肺脓疡、免疫性溶血性贫血、脑膜脑炎、心肌炎、心包炎、肾炎、社区获得性肺炎等疾病患者或疑似患者。肺炎衣原体感染如肺炎、咽炎、喉炎等疾病患者或疑似患者。沙眼衣原体感染新生儿肺炎和黄疸疾病患者或疑似患者。样本采集过程中注意无菌操作。

采集的样本为呼吸道感染婴幼儿患者或疑似患者痰液。痰液样本在病人发病3天内采集, 请患者先用清水漱口, 深呼吸并屏气5秒钟, 将其慢慢呼出。再做一次深呼吸, 努力咳嗽出痰液, 将痰液吐到专用的塑料杯中, 加入3-5mL无菌生理盐水, 拧紧杯盖。

临床标本在运输和贮存过程中要避免反复冻融, 反复冻融超过5次会引起样本降解, 如果不能确保-20℃的条件, 应该在0-8℃运输, 在此条件下, 保存不超过7天, 超过7天会引起低浓度样本降解。-20℃保存期限是6个月, -70℃可以长期保存。运输和保存过程中要附有必要的信息, 如标本编号、发病日期和标本采集日期。

临床样本经过抽提后所得核酸在4℃可保存30天, 超过30天会引起低浓度核酸的降解, 反复冻融不宜超过7次, 否则, 低浓度样本易降解成阴性, 在-20℃可保存12个月 (超过12个月效果未验证)。

【检验方法】

1 样品处理

样本处理请参照核酸抽提试剂盒说明书进行, 在样本处理过程中, 在添加样本时, 同时加入内标, 按照5μL/人份的量进行添加。强阳性质控品和弱阳性质控品与样本进行平行处理。采用生理盐水作为阴性抽提对照。

2 扩增试剂准备 (PCR I 室)

2.1 从试剂盒中取出缓冲液、引物探针和水, 在冰上或4℃融化, 取出酶, 轻微摇晃混匀并低速简短离心。取出1个无菌无核酸酶的离心管, 做好标记, 每人份按照下表进行反应体系的配置, PCR反应的总数应为样本个数、2个阳性质控、1个阴性抽提对照和1个PCR反应阴性对照的总和。

试剂	体积
缓冲液	6.0 μ L
引物探针	2.0 μ L
酶	0.5 μ L
水	11.5 μ L

计算好各试剂使用量, 加入适当体积离心管中, 充分混匀, 简短低速离心, 向设定的荧光定量PCR反应管或96孔板中分别加入20.0μL, 转移至样本处理区。

2.2 加样 (PCR II 室)

在装有PCR反应液的PCR反应管中分别加入制备好的标本5.0μL (包括样本、强弱阳性质控和抽提阴性对照), 同时加5.0μL无菌水作为PCR反应阴性对照。

2.3 PCR反应 (PCR III 室)

将反应管放入荧光PCR检测仪中, 循环参数设定如下:

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
1	1	50	02:00
2	1	95	02:00
3	40	91	00:15
		58	01:00

荧光信号的收集定为FAM (CT, 沙眼衣原体)、VIC/HEX (MP, 肺炎支原体)、ROX (CP, 肺炎衣原体) 和CY5 (内标), 数据的采集定在58℃。在使用ABI7500仪器时, VIC/HEX荧光请选择VIC, 将“Quencher”栏和“Passive reference”栏选为“none”。在使用Stratagene MX 3000P和BioRad CFX96时, VIC/HEX荧光请选择HEX。

【阳性判断值】

通过临床试验结果分析, 利用ROC曲线法最终确定本试剂盒中FAM荧光的阳性判断值是35.02, ROX荧光的阳性判断值是34.92, VIC/HEX荧光的阳性判断值是34.96。

【检验结果的解释】

反应结束后, 仪器自动保存结果, 分析图像后调节Baseline的Start值、End值和Threshold值 (可自行调节, Start值可以在3-15之间, End值位于5-20之间)。PCR阴性对照靶基应为阴性或Ct≥37.00; 强阳性质控品FAM荧光、ROX荧光和VIC荧光的Ct值位于20.00-25.00之间; 弱

阳性质控品FAM荧光、ROX荧光和VIC荧光的Ct值均位于29.00-34.00之间。以上条件需要在同一次试验中同时满足，否则认为PCR反应无效，需要重新进行检测。具体如下：

- 1、一般情况下，内标的 Ct 值≤35.00；对具有典型 S 扩增曲线但因靶基因浓度过高而导致内标没有扩增时，可直接报告为阳性样本，也可将样本进行十倍梯度稀释重新测定。
- 2、待检样本没有 Ct 值或无典型 S 型扩增曲线时，为阴性样本；待检样品 FAM 荧光（CT）Ct≥35.02、VIC/HEX 荧光（MP）≥34.96 或 ROX 荧光（CP）Ct≥34.92 或无典型 S 型扩增曲线时，为阴性样本；
- 3、待检样本 Ct 值具备如下表所示条件，且呈典型 S 型扩增曲线时，判为阳性样本：

待检样本 real-time PCR 结果			鉴定结果
MP（VIC/HEX 荧光）	CP（ROX 荧光）	CT（FAM 荧光）	
Ct<34.96	Ct≥34.92	Ct≥35.02	肺炎支原体（MP）
C≥34.96	Ct<34.92	Ct≥35.02	肺炎衣原体（CP）
Ct≥34.96	Ct≥34.92	Ct<35.02	沙眼衣原体（CT）

- 4、采用本试剂盒进行检验得到的结果仅供临床参考，不作为治疗或其它临床管理的唯一依据；最适样本类型及感染后的最高病原体滴度时间未经验证，因此，在同一患者分次采集样本可能会避免假阴性结果；不合理的样本采集、运输和处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果；检测的病毒靶序列的变异会导致假阴性结果；可能会导致假阴性结果的未经验证的其它干扰因素包括：患者同时患有其它疾病时，其它疾病的病理代谢产物及针对其的治疗药物等因素。
- 5、试剂盒检测扩增图及分析示例（见图 1）。

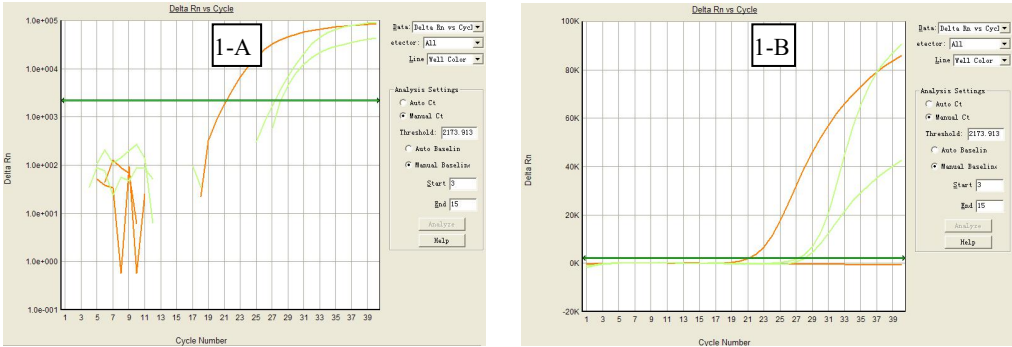


图 1：扩增曲线图示。1-A：指数扩增图。图 1-B：线性扩增图。

【检验方法的局限性】

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。样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将导致假阴性结果。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。对于含内标的试剂盒而言，当样本浓度过高时会导致内标扩增的失败。

【产品性能指标】

- 1. 以企业内部制定的参考品为待检样品，检测结果要求符合以下质量标准：
 - 1.1 阴性参考品符合率：8 份阴性参考品，应检出阴性；
 - 1.2 阳性参考品符合率：12 份阳性参考品由 MP、CP 和 CT 的阳性核酸组成，其中，参考品 CCM P1-P2 检出沙眼衣原体（CT）阳性，ct 值小于 25，CCM P3-P4 检测 CT 阳性，ct 值在 25-33 之间；CCM P5-P6 检出肺炎衣原体（CP）阳性，ct 值小于 25，CCM P7-P8 检测 CP 阳性，ct 值在 25-33 之间；CCM P9-P10 检出肺炎支原体（MP）阳性，ct 值小于 25，CCM P11-P12 检测 MP 阳性，ct 值在 25-33 之间。
 - 1.3 最低检测限检出要求：最低检测限参考品CCM L1-L3，Ct分别在28左右、31左右、34左右；其中L1、L2和L3对应的靶基因浓度分别是50000拷贝/mL、5000拷贝/mL和500拷贝/mL左右。
 - 1.4 重复性检测要求：精密度参考品进行10次重复检测，Ct值的变异系数CV≤5%；
 - 1.5 PCR反应阴性对照检出应为阴性；
 - 1.6 弱阳性质控品的Ct值29-34；
 - 1.7 强阳性质控品的Ct值20-25；
 - 1.8 按相应的实验规范操作，内标（CY5）的Ct值应≤35。
- 2. 本试剂盒采用基因测序法作为临床试验对比方法，根据产品临床试验对比结果，本试剂盒灵敏度和特异度均高于 90%。
- 3. 与感染部位相同或者感染症状相似的其他病原体（如带状疱疹病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、腺病毒、单纯疱疹病毒、鼻病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、链球菌、金黄色葡萄球菌和肺炎球菌）无交叉反应。
- 4. 当常见干扰物质如血液、脓液、肺炎治疗用药物阿莫西林、罗红霉素和阿奇霉素在检验样本中浓度分别是 10%、5%、0.2g•L⁻¹、0.03g•L⁻¹ 和 0.15g•L⁻¹ 时，不会影响到对样本检测结果的判断。

【注意事项】

- 1、整个检测过程应分三区进行，一区进行试剂准备；二区进行标本处理、反应体系的配制；三区进行扩增、荧光检测和结果分析。各区的仪器、设备和工作服独立使用，以防污染。
- 2、在操作中，应时刻注意避免 DNA 和 DNase 的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性薄壁进口 200μL PCR 管（或 96 孔 PCR 板加光学贴膜）、移液器头（带滤嘴自卸式），不能用手直接触摸反应管。
- 3、处理标本时应使用生物安全柜，以保证操作人员安全和防止对环境的污染。实验中的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中妥善处理。操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用 1.0%次氯酸钠及/或 70%乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。
- 4、离心管装试剂在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离心管底部。配制反应体系时应注意：所有液体的混匀尽量要在漩涡混合器上进行，不用移液器吹打，免产生气泡，反应体系配制完毕低速离心数秒。试剂盒请在保质期内使用。不同批号的试剂请勿混用。

【参考文献】

- [1] YangLiu,Xinyu Ye,Hong Zhang, et al. Antimicrobial Susceptibility of Mycoplasma pneumoniae Isolates and Molecular Analysis of Macrolide-Resistant Strains fromShanghai, China. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY.2009,53(5):2160–2162 .
- [2] Rours GI, Hammerschlag MR, Van Doornum GJ, et al.Chlamydia trachomatis respiratory infection in Dutch infants. Arch Dis Child. 2009,94(9):705-7.
- [3] Nasution TA, Cheong SF, Lim CT, Multiplex PCR for the detection of urogenital pathogens in mothers and newborns. Malays J Pathol. 2007,29(1):19-24.
- [4] DeliXin, Zuhuang Mi,Xu Han, et al. Molecular Mechanisms of Macrolide Resistance in Clinical Isolates of Mycoplasma pneumoniae from China. ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY.2009,53(5):2158–2159.
- [5] Khan ER, Hossain MA, Paul SK, et al. Molecular diagnosis of genital Chlamydia trachomatis infection by polymerase chain reaction. Mymensingh Med J. 2011,20(3):362-5.
- [6] Robin Brittain-Long, Sandra Nord, Sigvard Olofsson, et al. Multiplex real-time PCR for detection of respiratory tract infections. Journal of Clinical Virology,2008, 1:53–56.
- [7] Maass V, Kern JM, Poeckl M, et al.Sequence Homologies between Mycoplasma and Chlamydia spp. Lead to False-Positive Results in Chlamydial Cell Cultures Tested for Mycoplasma Contamination with a Commercial PCR Assay. J Clin Microbiol. 2011,49(10):3681-2.
- [8] Brittain-Long R, Andersson LM, Olofsson S, et al. Seasonal variations of 15 respiratory agents illustrated by the application of a multiplex polymerase chain reaction assay. Scand J Infect Dis. 2011 Aug 26. [Epub ahead of print]
- [9] Thurman KA, Warner AK, Cowart KC, et al. Detection of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, and Legionella spp. in clinical specimens using a single-tube multiplex real-time PCR assay. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 ,70(1):1-9.
- [10] Mitchell CM, Hovis KM, Bavoil PM, et al.Comparison of koala LPCoLN and human strains of Chlamydia pneumoniae highlights extended genetic diversity in the species. BMC Genomics. 2010,21;11:442.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏默乐生物科技股份有限公司

住 所：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F-7F 东

联系方式：0523-86080606 邮编：225300

售后服务单位：江苏默乐生物科技股份有限公司

联系方式：0523-86080606 邮编：225300

生产地址：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F、7F 东

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20080073 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20143402201

【说明书批准及修改日期】2019.09.17

【生产日期和失效日期】见标签