

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：肺炎衣原体核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】32 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的肺炎衣原体 DNA。

肺炎衣原体(CP)是一种广泛流行的呼吸系统病原体，主要引起急性和慢性呼吸道疾病，约 30% 患者出现严重的肺炎、支气管炎或者其他上呼吸道疾病。本试剂盒只用于临床辅助诊断。

【检验原理】本试剂盒运用特异性 PCR 引物扩增肺炎衣原体的保守序列，并结合 FAM 荧光基团标记的新型探针检测样本中的肺炎衣原体 DNA。该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对肺炎衣原体核酸的自动化检测。本试剂盒采用了 dUTP-UDG 酶防污染体系来降解扩增污染产物以降低假阳性率。

【主要组成成分】

名称	规格	数量	组成成分
样本处理液	1.8mL/管	1	NP 40, SDS
肺炎衣原体 PCR 反应液 A	950μL/管	1	引物、探针、dUTP/dNTPs Mixture
肺炎衣原体 PCR 反应液 B	7.5μL/管	1	Taq DNA 酶、UDG 酶
肺炎衣原体阴性对照	20μL/管	1	灭菌超纯水
肺炎衣原体阳性对照	20μL/管	1	CP 质粒 DNA

注：不同批次的试剂盒各组份不能混用。

【储存条件及有效期】试剂盒应在-20℃以下温度避光保存，避免反复冻融，有效期 12 个月；生产日期、使用期限或失效日期见标签。

【适用仪器】本产品适用于 ABI 7500、ABI 7300、Roche LightCycler® 480、Bio-Rad CFX96 及上海宏石 SLAN96P 实时荧光 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 样本类型：痰液
2. 样本采集：清水反复漱口后用力咳痰，从呼吸道深部咳出新鲜痰液于无菌容器送检。
3. 临床样本储存、运输

采集样本应立即送检，如当天不能检测时在 2~8℃保存不应超过 24 小时，-20℃保存不超过 3 个月，在-70℃可长期保存。应该避免反复冻融，冻存样本解冻后应充分混匀。采用冰壶加冰或泡沫箱密封进行运输。

【检验方法】

1. 核酸提取过程（在样本处理区操作）

1.1 向样本中加入 4 倍体积 4% 的 NaOH 溶液摇匀，室温放置 30min 左右，使其充分液化，用吸嘴混匀后吸取 1mL 液体至 1.5mL 灭菌离心管中，12000rpm 离心 5min，弃上清液留沉淀，再用 1mL 生理盐水洗涤 1 次，12000rpm 离心 5min，弃上清液留沉淀。

1.2 向沉淀中加入 50 μ L 样本处理液，振荡混匀。

1.3 100℃干浴或沸水浴 10min，12000rpm 离心 10min 备用。

注：建议已处理的 DNA 样品最好于当天进行 PCR 检测，当天不能检测的样品应置于-20℃保存。

2. 扩增反应过程

2.1 反应体系配制（在试剂准备区操作）

每个反应按 30 μ L 体系配制 PCR 反应混合液，其中肺炎衣原体 PCR 反应液 A 27.78 μ L，肺炎衣原体 PCR 反应液 B 0.22 μ L。检测所需反应混合液体积为 $[27.78 \times (n+2) + 0.22 \times (n+2)] \mu$ L，n 为检测样本数，2 为肺炎衣原体阴、阳对照；将反应混合液混合均匀并短暂离心后，分装至 PCR 反应管中，每管 28 μ L；最后将反应管转至样本处理区。

2.2 加样过程(在样本处理区操作)

向反应管中加入 2 μ L 处理的样本 DNA 及肺炎衣原体阴性对照和肺炎衣原体阳性对照，盖紧管盖，混匀短暂离心后置于荧光 PCR 仪上扩增检测。

3. PCR 扩增检测（扩增反应和检测区）

按以下条件设置扩增和检测参数，不同仪器的设置方法参照仪器使用说明。

3.1 荧光检测参数设置：设置能收集 FAM 荧光信号的荧光检测通道。

3.2 PCR 扩增参数设置：

阶段	温度	时间	循环数	备注
1	50℃	2min	1 cycle	
2	95℃	10min	1 cycle	
3	95℃	15sec	40 cycle	
	64℃	1min		信号收集

4. 质控标准

质控检测结果必须符合下述条件

4.1 肺炎衣原体阴性对照：阴性无扩增，结果为阴性。

4.2 肺炎衣原体阳性对照：结果为阳性，且在 FAM 荧光通道下的 Ct 值为 $25 < Ct \leq 29$ 。

以上两项需在一次试验中同时满足，否则，本次实验无效，全部实验应重新进行。

5. 结果分析

5.1 基线（Baseline）设定：根据不同仪器的要求设定，在 1-10 个循环之间设置基线起始位置，在 5-20 个循环之间设计基线结束位置。

5.2 阈值（Threshold）设定：以阈值线刚好超过正常阴性对照曲线（无规则的噪音线）的最高点为准，分别对每个样本进行结果分析。

5.3 仪器自动分析并计算出每个样本的 Ct 值。

【阳性判断值】

FAM 荧光通道下肺炎衣原体的结果判断：扩增曲线呈现典型的“S”型且 $Ct \leq 37$ ，则判断结果为肺炎衣原体阳性；无 Ct 值或 Ct 值为 40，则判断结果为肺炎衣原体阴性；如 $37 < Ct \leq 40$ 之间，建议此样本重做，若重新检查 Ct 值 < 40 则判断为肺炎衣原体阳性，否则判断为肺炎衣原体阴性。

【检验结果的解释】本试剂检测结果为阳性时，表明本次临床样本中含有肺炎衣原体病原体核酸，其结果并不能单独作为确诊或排除病例的依据，仅为临床提供

参考。

【检验方法的局限性】本试剂盒的阳性检测结果只表明在其灵敏度范围内为阳性。样本检测结果和样本收集、处理运输及保存质量有关，其中任何失误将会导致假阴性结果。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能会出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 灵敏度：本试剂盒以质粒参考品为样本，肺炎衣原体检测灵敏度均不高于 $1.0 \times 10^2 \text{ Copies}/\mu\text{L}$ 。
2. 特异性：检测 3 份企业肺炎衣原体特异性参考品，检测结果均为阴性。
3. 精密性：重复 10 次检测企业肺炎衣原体阳性参考品和肺炎衣原体灵敏度参考品，检测结果的 Ct 值的变异系数（CV）不大于 5.0%。
4. 交叉反应：经试验验证肺炎支原体、嗜肺军团菌和结核分歧杆菌与本产品无交叉反应。
5. 干扰试验：经试验验证临床样本中的血液和黏液对本试剂检测效果无干扰影响。

【注意事项】

1. 严格执行行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范。
2. 本试剂盒仅用于体外检测，使用前请仔细阅读试剂盒说明书全文。
3. 实验请严格分区操作：第一区：试剂准备区——准备所需试剂，第二区：样本处理区——待检样品及对照样品处理，第三区：扩增反应和检测区——扩增及结果分析
4. 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染。
5. 试剂盒内各试剂使用前，充分溶化后稍离心，避免反复冻融。
6. 实验过程中请穿工作服，带一次性手套并要勤换手套，建议使用带滤心的一次性吸嘴。
7. 加样、分装时应尽量避免产生气泡，反应前注意检查各反应管是否盖紧，以免泄露污染仪器。
8. 试剂盒内的阳性对照应视为具有污染性物质，应注意避免污染其他样品和反应试剂，导致错误检验结果。
9. 分析完毕后反应管密封在专用的容器内，丢弃于指定地点；实验过程中废弃物和一次性耗材需经过灭菌后丢弃。
10. 工作台及各物品定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精或紫外灯处理。

【参考文献】

- [1]. Burillo A, Bouza E. Chlamydia pneumoniae. Infect Dis Clin North Am, 2010, 24: 61-71.
- [2]. C. A. Heid, J Stevens, K. J. Livak, P. M. Williams, Real time quantitative PCR, Genome Res. 1996, 6, 986-994.
- [2]. WHO 实验室生物安全手册（第 3 版）。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：深圳康美生物科技股份有限公司
住 所：深圳市南山区深圳湾科技生态园 9 栋裙楼 5 层 29-30
联系方式：
售后服务单位名称：
联系方式：

生产地址：深圳市南山区深圳湾科技生态园 9 栋裙楼 5 层 29-30
 深圳市南山区深圳湾科技生态园 10 栋 B 座 32 层 03-04
医疗器械生产许可证编号：
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】
【说明书批准日期及修改日期】 年 月

