



肺炎支原体核酸检测试剂盒（RNA 恒温扩增）

说明书

【产品名称】

通用名称：肺炎支原体核酸检测试剂盒（RNA 恒温扩增）

【包装规格】20 人份/套，100 人份 / 套。

【预期用途】

该产品用于人痰液和咽拭子样本中肺炎支原体核酸的定性检测。

肺炎支原体感染广泛，好发年龄约为 5~20 岁，有发热、厌食、咳嗽、畏寒、头痛、咽痛、胸骨下疼痛等症状。目前肺炎支原体的主要检测方法有：培养法、血清学检查和 PCR 法。该产品可用作临床辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒的肺炎支原体（MP）核酸检测分为核酸提取和恒温扩增检测。

在核酸提取过程中，支原体裂解释放出的核酸借助核酸提取液中的捕获探针与磁性颗粒特异结合，在不需要传统的离心操作的情况下，通过清洗磁性颗粒而获得纯净的 MP 靶标核酸（RNA）。

实时荧光核酸恒温扩增检测技术（Simultaneous Amplification and Testing, SAT）使用 M-MLV 反转录酶、T7 RNA 多聚酶和优化探针技术来同时实现。反转录酶用于产生靶标核酸（RNA）的一个 DNA 拷贝，T7 RNA 多聚酶从 DNA 拷贝上产生多个 RNA 拷贝，带有荧光标记的优化探针和这些 RNA 拷贝特异结合，从而产生荧光，该荧光信号可由检测仪器捕获。

检验结果根据实时荧光信号的出现时间和强度，结合阳性对照、阴性对照、内标信号和熔解曲线对检验结果进行判定。

【主要组成成分】

试剂 A

组成成分	20 人份/套	100 人份/套	主要成分
样本保存液	1×10mL	1×50mL	去垢剂
核酸提取液	2×1.0mL	1×10mL	捕获探针和磁性颗粒
洗涤液	1×40mL	1×200mL	SDS

试剂 B

组成成分	20 人份/套	100 人份/套	主要成分
反应液	1×800μL	1×4mL	dNTPs、NTPs
酶液	1×200μL	1×1mL	反转录酶，T7 聚合酶
检测液	1×50μL	1×250μL	引物、荧光探针
阳性对照	1×50μL	1×250μL	MP RNA
内标	1×50μL	1×250μL	MP IC RNA
阴性对照	1×50μL	1×250μL	生理盐水

注：请勿互换、混合或合并不同批号的试剂盒中的试剂。

生理盐水：无 RNase 污染的生理盐水，须自行准备。

【储存条件及有效期】

试剂 A：2~30℃，试剂 B：-15℃~-35℃ 保存，有效期：12 个月。

检测液要避免光保存，避免反复冻融，打开包装使用后的试剂 B 可于 2~8℃ 存放一个月。试剂 A 可于 2~30℃ 运输，试剂 B 可于 20℃ 以下运输 3 天。生产日期、使用期限或者失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI Prism 7500 荧光定量 PCR 仪、LightCycler480、天隆 TL988。

【样本要求】

1. 适用样本类型：痰液、咽拭子。

2. 样本采集（注意防止标本污染）

2.1 痰液样本：将吸痰器插入咽喉部，取气管深部分泌物，往其中加入 4 倍体积的生理盐水，用 1mL 枪头反复吹打，待液化后取 500μL 加入到 500μL 样本保存液中备用，该样品即为待测样本。

2.2 咽拭子样本：用医用棉拭子取咽部分泌物，将拭子头放入 1mL 生理盐水浸泡贴管壁挤干，取 500μL 加入到 500μL 样本保存液中备用，

该样品即为待测样本。

3. 保存：待测样本可立即用于测试，-20℃ 保存不超过 3 个月，-70℃ 可长期保存，应避免反复冻融。

4. 运输：运送采用 0℃ 冰壶。

【检验方法】

Part A、手工核酸提取操作检验方法

1. 试剂准备

1.1 将所有试剂温度平衡到室温（18~26℃），充分混匀。试剂 B 内各试剂在充分溶解后请稍事离心。

1.2 扩增检测液的准备

按照每个样品取 40μL 反应液和 2.5μL 检测液计算，配制所需扩增检测液（反应液和检测液的混合物），振荡混匀，3000~4000rpm 离心 10 秒备用。例如：样本数为 n，反应数即为 n+2（待测样本数+阴性对照+阳性对照），则配制扩增检测液的方法即为：40×（n+2）μL 反应液+2.5×（n+2）μL 检测液混匀。

2. 对照品准备

2.1 内标

取 400μL 样本保存液，加入 10μL 内标，混匀备用。

2.2 阳性对照

取 200μL 生理盐水，加入 200μL 样本保存液后，再加入 10μL 阳性对照品，混匀备用。

2.3 阴性对照

取 200μL 生理盐水，加入 200μL 样本保存液后，再加入 10μL 阴性对照品，混匀备用。

3. 样品处理

3.1 准备样品处理管（1.5 mL 离心管，数量为：待测样本数+2），分别标记待测样本编号及阳性、阴性对照；

3.2 每管分别加入 100μL 核酸提取液（用前混匀），10μL 步骤 2.1 准备的內标，盖盖震荡 30 秒；

3.3 使用洁净 Tip 头分别吸取 400μL 待测样品、阳性对照（步骤 2.2 准备）和阴性对照（步骤 2.3 准备），加入对应标记的样品处理管；

3.4 置于 60℃ 保温 5 分钟；然后室温放置 10 分钟。

4. 样品 RNA 提取

4.1 将样本处理管置于磁珠分离装置上，静置 5 分钟，待磁珠吸附于管壁后，用移液器吸干管盖和管中的气泡和液体，保留磁珠，完成后应清晰可见磁珠；

4.2 加入洗涤液洗涤两次，每次加入 1 mL 洗涤液震荡混匀并重复步骤 4.1)；

4.3 将 EP 管移离磁珠分离装置，每管分别加入 40μL 扩增检测液，震荡混匀，取 30μL 磁珠悬液至新的微量反应管中。

5. 核酸扩增检测

5.1 开启荧光检测仪器并完成预热：设定荧光检测仪器反应程序条件为：42℃ 1 分钟，40 个循环，荧光素通道设定为 F1（FAM）和 F2（HEX 或者 VIC），荧光信号收集每分钟进行一次；从 40℃ 到 80℃ 的熔解曲线分析，反应体系 40μL。ABI7500 需要在新建文档的 Assay 下拉菜单中选择 Isothermal，Passive Reference 选择 none。

5.2 将上述中准备好的微量反应管置于 60℃ 保持 10 分钟，然后立即置于 42℃ 保持 5 分钟，同时将酶液也预热到 42℃；

5.3 保持微量反应管于 42℃，用连续加样器向每管分别加入 10μL 已预热的酶液，立即盖上管盖，1200rpm 震荡 15 秒钟混匀；

5.4 微量反应管迅速转至荧光检测仪器，立即启动反应程序。

Part B、全自动核酸提取仪（Mag X-嘉实凯实生物科技有限公司）操作检验方法（可根据批准的仪器操作手册进行适当调整）

6. 试剂及耗材准备

6.1 将所有试剂放室温平衡，充分溶解并混匀。

6.2 耗材准备：将 250 μ L、1mL Tip 头、六连排管、微孔板、废液桶、废液桶放到实验台的对应区域的板架。

6.3 将所有准备好的试剂放到仪器试剂区的模块内，向洗涤液桶中装入洗涤液。

6.4 将样本垂直放入样本架，再将样本架插入仪器中的样本槽。

7. 软件操作

接通电源，打开电脑和仪器黄色软启动开机按钮，运行软件。并设置软件：

- (1) 新建模板：新建一个实验程序。
- (2) 设置样本：选择样本放置的孔位，按照设置的样本编号点击填充样本号，设置样本检测项目试剂。
- (3) 设置反应管：根据 SAT 反应区的样本位置进行反应管选择。
- (4) 设置微孔板：根据 SAT 反应区反应管位置进行微孔板选择。
- (5) 设置试剂：根据检查项目设置试剂。
- (6) 设置吸头：根据吸头实际位置在软件界面对应孔点击“装入”。
- (7) 运行监控：确定仪器操作流程，点击运行，自动提取结束后，按检验方法步骤 5.1 操作完成荧光检测仪的设置，然后确认加酶，将微量反应板（管）转移到荧光检测仪，立即启动反应程序。

8. 质量控制

8.1 应用临界弱阳性对照进行实验室质控

为了防止出现漏检（假阴性）的情况，SAT 检测实验室应定期应用临界弱阳性对照进行室内质量控制。

- 8.1.1 临界弱阳对照的制备：取生理盐水和样本保存液按照 1：1 混合作为稀释液，将试剂盒提供阳性对照品稀释 100 倍即为临界弱阳性对照。
- 8.1.2 临界弱阳性对照的使用方法：取 200 μ L 生理盐水加入 200 μ L 样本保存液中，混匀后加入 10 μ L 临界弱阳性对照，混匀备用；样本处理和检测过程参照检验方法中的 3、4、5 或者 6、7。

8.2 实验质量控制：

所设置阳性对照、临界弱阳性对照和阴性对照的 dt 值应满足以下条件，否则，实验视为无效，需重新进行。

- (1) 阳性对照、临界弱阳性对照：F1 通道：阳性对照 dt $\leq$ 临界弱阳性对照 dt $\leq$ 35，同时熔解曲线在 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 区间有吸收峰，F2 通道有或者无数值。
- (2) 阴性对照：F1 通道：dt 无数值或为 40，熔解曲线在 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 区间无吸收峰，同时 F2 通道：dt $\leq$ 35。

9. 实验结果

9.1 阈值设定：以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点；

9.2 读取 dt 值，dt 表示样本曲线与阈值线交点的横坐标读数（与一般实时荧光 PCR 实验结果的 ct 值类似）。

【阳性判断值】

- 通过对检测下限浓度 RNA 大量实验和临床实验的数据统计分析，确定阳性标本 F1 通道 95% 置信区间的 dt 值范围为：dt $\leq$ 35，99% 置信区间为：dt $\leq$ 40，F2 通道有或者无数值。
- 通过对阴性标本大量数据统计分析，确定阴性标本 F1 通道无数值或为 40，F2 通道的 dt 值范围为 dt $\leq$ 35。
- 通过对大量样本检测结果的 Tm 分析，确定熔解曲线 Tm 范围为 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C。

【检验结果的解释】

所设置阳性对照和阴性对照的 dt 值应满足质量控制的要求，否则，实验视为无效，需重新进行。

阳性结果判断：

F1 通道 dt $\leq$ 35 且熔解曲线在 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 区间有吸收峰，F2 通道有或者无数值的样本为阳性；

F1 通道 35<dt $\leq$ 40，F2 通道有或者无数值的样本建议重新检测，检测结果 dt $\leq$ 40 且熔解曲线在 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 区间有吸收峰的样本为阳性。

阴性结果判断：

a、F2 通道 dt $\leq$ 35，且 F1 通道 dt 无数值或为 40，同时熔解曲线在 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 区间有或者无吸收峰，均为阴性；

b、F1 通道：dt $\leq$ 35 但熔解曲线在 64 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 区间没有吸收峰，同时 F2 通道有或者无数值，则为阴性。

注：1、如果标本 F1 通道为 dt 无数值或为 40，F2 通道也为 dt 无数值或大于 35，则说明反应可能受到抑制，此标本检测结果无效，建议重新检测。

2、因 MP 存在携带但不发病的状态，阳性结果指示肺炎支原体的存在，

但不能作为充分的临床诊断依据。临床的诊断需要实验室的检验结果与临床症状相结合。

【检验方法的局限性】

1. 因为支原体的检测结果很大程度上依赖于标本的采集，所以一次的阴性结果并不能确定没有感染。
2. 在 SAT 定性检测中，阳性判定值（dt）的建立，是在一定的统计学基础上，相对于某个具体的受检者来说，其有可能并不具备正确性。

【产品性能指标】

1. 由于本产品为定性产品，产品检测的线性范围没有确定；本产品的检测灵敏度确定为 10³copies/反应；与大肠杆菌、绿脓杆菌、金葡球菌、肺炎克雷伯菌、解脲脲原体、生殖支原体、沙眼衣原体、流感病毒、结核分枝杆菌、鸟型分支杆菌、人巨细胞病毒等病原体无交叉反应，检测上限定为 $\geq$ 10⁶copies/反应。血液样本不影响检测结果，脓液样本对检测有一定的抑制作用，可以考虑进行梯度稀释后再进行检测。
2. 以 PCR 法为金标准，测序作为扩大金标准，本产品临床研究性能为敏感性为 99.23%，特异性为 99.15%，准确度为 99.18%。

【注意事项】

1. 由于本产品的检测靶标为 RNA，操作过程中应特别注意防止 RNase 对 RNA 的降解作用，所有使用的器皿、加样器等均为专用，离心管、吸头等一次性耗材在实验前应全部高压灭菌或购买无 RNA 酶的离心管和吸头。在实验操作之前请操作人员戴上无粉手套、口罩，穿好实验服。
2. 操作过程的环境温度应控制在 18~26 $^{\circ}$ C。
3. 如果没有特别说明，请勿合并任何分析试剂或溶液。
4. 试剂 B 应避免反复冻融。
5. 检测液对光敏感，在储存期间和使用准备期间应避免曝光。
6. 洗涤液室温平衡后如果仍有白色絮状沉淀物，用之前应先 37 $^{\circ}$ C 加热，直至澄清。
7. 如果在磁珠吸附过程中有个别磁珠难以吸附至管壁则应适当延长吸附时间。
8. 酶在用之前要先离心，并将温度平衡至 42 $^{\circ}$ C。
9. 在加酶之前，请确认仪器及程序设置已准备好并成功试运行！加酶之后 SAT 反应就立即开始，荧光检测需要马上开始。
10. 反应结束后，直接将微量反应管取出浸泡于 10% 84 消毒液中，取微量反应管应小心操作，严禁打开反应管（防止污染反应区）！实验结束后用 10% 84 消毒液清洁工作区及用具，最后用清水擦拭干净。
11. 所有临床样品都可能是潜在的污染源，操作应戴手套，使用过的试剂瓶，棉签等必需经无菌处理才可丢弃，进行分析操作时，应建立规范的器具操作和废物处理规程。妥善处置所有接触到标本和试剂的材料，彻底清洗并消毒所有操作台面。
12. 本试剂盒仅用于体外诊断。
13. 手工提取和仪器提取结果一致。
14. 仪器维护：运行结束后清理仪器上的废料与废液，清洁保养仪器。

【参考文献】

1. 《支原体肺炎临床路径》（2009 版）

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海仁度生物科技股份有限公司

注册人住所：上海市张江高科技园区东区瑞庆路 528 号 15 幢乙号

售后服务单位名称：上海仁度生物科技股份有限公司

邮政编码：201201

电话：021-50720200

传真：021-50720186

网址：www.rdbio.com

生产地址：上海市张江高科技园区东区瑞庆路 528 号 10 幢乙号 3 层；瑞庆路 528 号 8 幢甲 6 层；瑞庆路 590 号 7 幢 301 室

生产许可证编号：沪食药监械生产许 20081588 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20173400156

【说明书核准及修改日期】2020 年 12 月 07 日