

(1) 咽拭子: 样本采集管(含拭子)充分震荡混匀, 挤干拭子, 吸取采集管中全部液体转移至 1.5mL 离心管中。13,000rpm 离心 2 分钟, 弃去上清。沉淀中加入 50μL 核酸抽提液*充分混匀, 99°C 干浴或水浴 10 分钟, 然后 13,000rpm 离心 10 分钟, 取上清 4μL 作为 PCR 反应模板。

(2) 对照品: 取阳性对照品、阴性对照品各 50μL, 分别加入核酸提取液*50μL 充分混匀, 99°C 干浴或水浴 10 分钟, 然后 13,000rpm 离心 10 分钟, 取上清 4μL 作为 PCR 反应模板。

2. 试剂配制 取 n×36μLMP&CP 核酸荧光 PCR 检测混合液与 n×0.4μL 酶 (Taq+UNG) (n 为反应管数), 振荡混匀数秒, 3000rpm 离心数秒。

3. 加样 取上述混合液 36μL 置于 PCR 反应管中, 然后再将样本、阳性对照品、阴性对照品处理上清液各 4μL 分别加入 PCR 反应管中, 盖好 PCR 反应管盖, 立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增 反应管置于荧光 PCR 仪上, 推荐循环参数设置:

37°C×2min; 94°C×2min; 再按 93°C×15sec→60°C×60sec, 循环 40 次; 单点荧光检测在 60°C。反应体系为 40μL。

荧光通道检测选择如下:

机型\通道	1	2	3
ABI7500	FAM	VIC	TEXAS RED
CFX96	FAM	VIC	Cal Red 610
SLAN	通道 1	通道 2	通道 3

备注: 如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪, 请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择 “none”。

5. 基线和阈值设定 基线调整取 6-15 个循环的荧光信号, 阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

6. 质量控制 阴性对照品检测结果应为: FAM 通道 和 VIC 通道 Ct 栏显示 Undetermined (ABI7500) 或 N/A (CFX96) 或 No Ct (SLAN), 610 通道 Ct 值≤38 (且有明显 S 型扩增曲线); 阳性对照品检测结果应为: FAM 通道和 VIC 通道 Ct 值均≤35, 且有明显 S 型扩增曲线。否则实验视为无效。

7. 试验结果的判断

	FAM 通道	VIC 通道	610 通道	结果判断
1	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤38, 且有明显 S 型扩增曲线	MP、CP 阴性
2	Ct 值≤38, 且有明显 S 型扩增曲线	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	——(见注 1)	MP 阳性
3	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤38, 且有明显 S 型扩增曲线	——(见注 1)	CP 阳性
4	Ct 值≤38, 且有明显 S 型扩增曲线	Ct 值≤38, 且有明显 S 型扩增曲线	——(见注 1)	MP 阳性、CP 阳性

待检样本 Ct 值在 38-40 之间, 需重复测定, 如仍在 38-40 之间, 则判为低于检测限, 报告为阴性。

注 1: 对于 FAM 通道或 VIC 通道具有明显 S 型扩增曲线 (Ct≤38) 的样本, 其 610 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线 (Ct≤38), 也可能因为高浓度的目的基因竞争性抑制而导致无 S 型扩增曲线或 No Ct。

【阳性判断值】根据临床试验数据绘制 ROC 曲线, 确定本试剂盒的参考值 (阳性判断值) 为 Ct=38。

【对检验结果的解释】实验室环境污染, 试剂污染, 标本交叉污染会出现假阳性结果; 试剂运输, 保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降, 出现假阴性或定量检测不准确的结果。当样本在 FAM、VIC 及 610 通道均显示为 Undetermined 时, 则表明 PCR 反应受到抑制或提取不当, 需重复试验。

【检验方法的局限性】① 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、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。② 阴性结果仅说明样本浓度低于本试剂盒的检出限值但不能完全排除感染的可能, 阳性结果建议采用金标准方法进一步确认。③ 有关假阴性结果的可能性分析: 当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测限时可能会发生假阴性的结果; 不合理的样本采集、转运及处理有可能会发生假阴性结果; 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子可能会导致假阴性结果; 试剂运输, 保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降, 出现假阴性的结果。④ 有关假阳性结果的可能性分析: 实验室环境污染, 试剂污染, 样本交叉污染会出现假阳性结果。

【产品性能指标】

- 最低检测限: 1×10^3 copies/mL;
- 分析特异性: 经验证本试剂盒与甲型流感病毒、乙型流感病毒、人副流感病毒、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型、肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、沙眼衣原体、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、百日咳杆菌、B 型流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、唾液链球菌、呼吸道腺病毒、副百日咳杆菌、麻疹病毒、人偏肺病毒、流行性腮腺炎病毒、鼻病毒均不会发生交叉。
- 企业阳性参考品: 用 MP 阴性参考品 MP P1~MP P5 进行检测, 检测结果应均为 MP 阳性且 CP 阴性 (符合率 5/5)。用 CP 阳

性参考品 CPP1~CPP5 进行检测, 检测结果应均为 CP 阳性且 MP 阴性 (符合率 5/5)。

- 企业阴性参考品: 用阴性参考品 N1~N7 进行检测, 检测结果应为 MP 和 CP 均为阴性 (阴性符合率 7/7)
- 企业最低检出限参考品: MP 最低检出限参考品 MP-S1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释, 检测结果均应为 MP 阳性。CP 最低检出限参考品 CP-S1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释, 检测结果均应为 CP 阳性。
- 精密性: 用高、低两个浓度的 MP 精密性参考品进行检测 (n=10), 检测结果 Ct 值的变异系数 (CV, %) 均<5%。用高、低两个浓度的 CP 精密性参考品进行检测 (n=10), 检测结果 Ct 值的变异系数 (CV, %) 均<5%。
- 干扰物质研究: 常用药物, 如布地奈德 (≤0.5mg/mL)、异丙托溴铵 (≤0.2mg/mL)、硫酸沙丁胺醇 (≤1.2mg/mL)、阿奇霉素 (≤0.66mg/L)、罗红霉素 (≤7.9mg/L)、妥布霉素 (≤14mg/L) 均不会干扰本试剂盒检测; 含粘蛋白 (≤0.9mg/mL) 标本或含 5% 血液标本不会干扰本试剂盒检测。

【注意事项】 本产品仅用于体外诊断, 未含人源性材料。开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

- 整个检测过程应严格分在三区进行: PCR 反应体系的配制区; 标本处理、加样区; PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台, 并进行消毒。
- 使用不含荧光物质的一次性手套 (经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
- 试剂准备和标本处理应使用超净工作台 (负压式) 或防污染罩, 以防止对环境污染。
- 每次实验应设置阴、阳性对照品。
- 操作人员应经过专业培训, 具有一定经验和操作技能。
- 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10% 次氯酸或 75% 酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
- 实验中接触过标准品和对照品的废弃物 (如吸头)、扩增完毕的离心管、标本等应进行无害化处理后方可丢弃。
- 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
- PCR 反应混合液应避光保存。
- 反应管中尽量避免气泡存在, 管盖需盖紧, 反应结束后严禁打开 PCR 反应管。
- 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

- [1] DEBORAH F. TALKINGTON,* W. LANIER THACKER,1 DAVID W. KELLER, AND JØRGEN S. JENSEN Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infection in Autopsy and Open-Lung Biopsy Tissues by Nested PCR JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 1998, p. 1151-1153
- [2] FANRONG KONG,1 SUSANNA GORDON,1 AND GWENDOLYN L. GILBERT Rapid-Cycle PCR for Detection and Typing of Mycoplasma pneumoniae in Clinical Specimens JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Nov. 2000, p. 4256-4259
- [3] ALFRED L. WARING, TANYA A. HALSE, CHARLES K. CSIZA, CYNTHIA J. CARLYN Development of a Genomics-Based PCR Assay for Detection of Mycoplasma pneumoniae in a Large Outbreak in New York State JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2001, p. 1385-1390
- [4] S. SHARMA,1* R. BROUSSEAU,2 AND S. KASATIYA3 Detection and Confirmation of Mycoplasma pneumoniae in Urogenital Specimens by PCR JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 1998, p. 277-280

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 上海之江生物科技股份有限公司

住所: 上海市张江高科技产业东区瑞庆路 528 号 20 幢乙 1 层、21 幢甲 1 层

联系方式: 021-34680028 E-mail: river@liferiver.com.cn

售后服务单位名称: 上海之江生物科技股份有限公司

联系方式: 021-34680028 E-mail: service@liferiver.com.cn

生产地址: 上海市闵行区新骏环路 588 号 26 幢

医疗器械生产企业许可证编号: 沪食药监械生产许 20081591 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20183401705

【说明书批准及修改日期】2022-5-20

肺炎支原体及肺炎衣原体核酸联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】
通用名称：肺炎支原体及肺炎衣原体核酸联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）
【包装规格】 25 人份 / 盒、50 人份 / 盒。
【预期用途】 本试剂盒用于对人咽拭子样本中的肺炎支原体（Mycoplasma pneumonia, MP）和肺炎衣原体（Chlamydia pneumonia, CP）的 DNA 核酸片段同时分别进行荧光 PCR 的定性检测。

本试剂盒可用于临床对肺炎支原体和肺炎衣原体感染的辅助诊断。本试剂盒的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。肺炎支原体（Mycoplasma pneumonia, Mp）是引起支原体肺炎的病原体，支原体肺炎的病理改变以间质性肺炎为主，常伴有咽炎、支气管炎。肺炎支原体感染临床症状一般较轻，起病缓，潜伏期约为 2~3 周，肺部常在整个病程中无任何阳性体征。大多数患者只有轻微上呼吸道感染，有咳嗽、发烧、喉咙痛、头痛及疲倦等症状，刺激性咳嗽为突出表现，多见干咳，严重者则可能患上肺炎。一般预后良好，少数可引起肺外并发症，尤其是伴有中枢神经系统病变者，其病情较重，预后较差。肺炎支原体主要通过呼吸道飞沫进行人人传播，其感染暴发流行多见于密闭环境中，如学校、幼托机构等，好发于学龄前儿童及青少年（5~20 岁），在我国社区获得性肺炎中约占肺炎总数的 15%~20%，流行年可高达 30%以上。一年四季均可发生，但多在秋冬时节。肺炎衣原体（Chlamydia pneumonia, Cp）是引起急性肺部炎症的病原体，常累及上下呼吸道，主要引起成人及青少年的非典型肺炎，也可引起咽炎、喉炎、扁桃体炎、鼻窦炎、支气管炎及肺炎。肺炎衣原体感染起病缓，病程长，一般症状轻，常伴咽、喉炎及鼻窦炎为其特点上呼吸道感染，症状消退后，出现干湿啰音等支气管炎、肺炎表现。咳嗽症状可持续 3 周以上。少数患者表现为高热、头痛、相对缓脉及肝脾大，重症患者出现昏迷及急性肾功能衰竭。肺炎衣原体治疗反应比肺炎支原体慢，如治疗过早停止，症状有复发趋势。老年人病死率为 5%~10%。肺炎衣原体感染方式可能为人与人之间通过呼吸道分泌物传播，也可能通过污染物传染，常在聚居场所流行，如家庭、学校、军队等。它在成人和儿童中大约引起了 10~20%的社区获得性肺炎，可见于 5%~10%患社区获得性肺炎的老年人，且症状严重。

【检验原理】 本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，利用特异性引物和荧光标记探针，对肺炎支原体（MP）特异性 DNA 核酸片段和肺炎衣原体（CP）的特异性 DNA 核酸片段同时进行荧光 PCR 检测。

序号	组分	包装规格		体积 / 人份	主要成分
		25 人份	50 人份		
1	核酸抽提液	1.4mL×1	1.4mL×2	50μL	氯化钠、EDTA-Na2
2	肺炎支原体及肺炎衣原体核酸荧光 PCR 检测混合液	972μL×1	936μL×2	36μL	2 对引物、3 条荧光探针及 PCR Mix
3	酶（Taq+UNG）	10.8μL×1	20.8μL×1	0.4μL	Taq DNA 聚合酶、UNG 酶
4	肺炎支原体及肺炎衣原体阴性对照品	50μL×1	50μL×1		0.9%氯化钠溶液
5	肺炎支原体及肺炎衣原体阳性对照品	50μL×1	50μL×1		含目的基因片段的缺陷性病毒
6	肺炎支原体及肺炎衣原体内标	30μL×1	60μL×1	1μL	含目的基因相似片段的缺陷性病毒

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

【储存条件和有效期】 试剂盒应在-20±5℃避光保存，有效期 12 个月。

采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封进行运输；荧光 PCR 检测混合液反复冻融不宜超过 3 次。生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】 本试剂盒适用于 ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪；Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪；上海宏石 S1an 荧光 PCR 检测系统。

【标本要求】
咽拭子：用拭子适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将拭子放入样本采集管（含有 1mL 生理盐水）中，尾部弃去，旋紧管盖并密封，以防干燥。样本可在 2℃~8℃放置 7 天，长期保存应置于≤-20℃条件下，避免反复冻融。

- 【检验方法】
1. 标本、对照品的核酸裂解处理
冻存样本和对照品请在室温融解，充分混匀后使用。
核酸抽提液*配制：取 N×50μL 核酸抽提液与 N×1μL 内标混匀，N=样本数。