



肺炎支原体核酸及耐药突变位点检测试剂盒（荧光PCR法）说明书

江苏默乐生物科技股份有限公司

【产品名称】
通用名称:肺炎支原体核酸及耐药突变位点检测试剂盒（荧光PCR法）

【包装规格】
16人份/盒

【预期用途】
本试剂盒用于体外定性检测临床前液样本中肺炎支原体及其大环内酯类抗生素耐药突变位点即23S rRNA 2063(A/G)和2064(A/G)突变位点。本试剂盒可用于肺炎支原体感染及耐药与否的临床辅助诊断。

肺炎支原体可以引起支原体肺炎、上呼吸道感染、支气管炎、肺脓肿、免疫性溶血性贫血、腮腺炎、心肌炎、心包炎、胃炎、社区获得性肺炎等疾病。大环内酯类是治疗肺炎支原体感染的首选药物，临床上，已分离出大环内酯类的耐药菌株。肺炎支原体耐药菌株感染者的发病持续时间、住院时间及治疗后发热持续时间均显著长于敏感株感染者。^①大环内酯类药物的结合位点位于23S rRNA结构域 V，此区域发生的核苷酸点突变会降低抗生素和核糖体之间的亲和力，从而阻碍抗生素产生抑制性。^②目前已发现的突变位点包括2063、2064、2067和2617。^③其中，A2063G被视为J14环大环内酯类抗生素耐药，A2064G被视为J4和J6环大环内酯类抗生素耐药，C2617G被视为J14和J15环大环内酯类抗生素耐药，A2067G被视为交叉敏感性。^④中国目前只发现2063和2064两个位点的点突变，最常见的是2063位点A到G的突变。^⑤根据P1基因限制性片段长度多态性分析，肺炎支原体分为 I 和 II 型，其中 I 型进一步细分为5种亚型（1a-1e），II 型进一步分为3种亚型（2a-2c）。本产品能检测到肺炎支原体96个基因亚型。^⑥临床实验室诊断肺炎支原体检测方法有免疫学方法和分离培养法，对肺炎支原体耐药突变位点的检测主要采用药物敏感试验的方法。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措施及防护程序。

【检测原理】
本试剂盒采用巢合锁链式反应（PCR）结合 Taqman 荧光探针技术对临床前液样本中肺炎支原体核酸及其耐药突变位点进行检测。针对P1基因保守区设计引物探针检测肺炎支原体，探针采用VIC荧光标记；针对23S rRNA基因突变位点设计引物探针检测A2063G和A2064G突变，探针采用FAM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C9荧光标记。强阳性质粒和弱阳性质粒品，包含P1基因序列和23S rRNA A2063G发生突变的基因序列，质粒品W包含23S rRNA 2063和2064位点均未发生突变的基因序列，不含P1基因序列。

【主要组成成分】
肺炎支原体核酸及耐药突变位点检测试剂盒（荧光PCR法）（16人份/盒）包括以下组分：

序别	料型	规格	数量（16人份/盒）
1	缓冲液	含镁离子、钾离子、dNTPs和Tris等	1管（120μL/管）
2	引物探针	含内标、肺炎支原体P1基因及23S rRNA A2063G和A2064G突变位点的引物探针等	1管（40μL/管）
3	酶	含DNA聚合酶和耐碱磷酸化酶	1管（90μL/管）
4	强阳性质粒品	含P1基因序列J25 rRNA A2063G发生突变的基因序列	1管（500μL/管）
5	弱阳性质粒品	含P1基因序列J25 rRNA A2063G发生突变的基因序列	1管（500μL/管）
6	质粒品W	23S rRNA 2063和2064位点均未发生突变的基因序列	1管（500μL/管）
7	内标	含内标基因	1管（200μL/管）
8	水	水	1管（1mL/管）

备注：1.本试剂盒配套使用的核酸提取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)，注册号是陕食药监械(准)字2011第J400125号。

【储存条件及有效期】

-20℃避光密封保存，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℃避光条件下贮存时间不宜超过5天，超过5天的检测结果不稳定；反复冻融超过7次效果未验证；开瓶情况下，于4℃可保存3天，超过3天检测结果不稳定，开封后，应避光密封保存于-20℃。
生产日期或失效日期见试剂盒外标签。

【适用范围】
本试剂盒适用于SuaGene 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支原体肺炎、支气管炎、肺脓肿、免疫性溶血性贫血、腮腺炎、心肌炎、心包炎、胃炎、社区获得性肺炎等疾病患者或疑似患者。样本采集过程中注意无菌操作。

采集的样本为患者或疑似患者痰液、痰液样本在病人发病天内采集，请患者先用清水漱口，深呼吸并屏气5秒种，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3mL 5mL无菌生理盐水，拧紧杯盖。

临床标本在运输和储存过程中要避免反复冻融，反复冻融2次后会降解，如果不能耐受-20℃的条件，应该在0℃-8℃运输，此条件下，可保存7天，超过7天会降解。-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、采样日期和标本采集日期。

提取后的核酸可反复冻融8次（超过8次效果未验证），4℃可保存30天（超过30天效果未验证），-20℃可保存12个月（超过12个月效果未验证）。

【检测方法】

1. 样品处理（PCR前置）
样本处理请参考核酸提取试剂盒说明书进行，请在样本处理过程中，在加样本时，同时加入内标，按照加入份数进行添加。MM加强型质粒品和MM弱阳性质粒品与样本进行一行处理，采用生理盐水作为阴性抽提对照。

2. 扩增反应的准备（PCR后置）
从试剂盒中取出缓冲液、引物探针和水在水上或4℃融化，取出酶，轻轻摇晃混匀并低速离心。取出1个无酶无核酸酶离心管，做好标记，每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个阴性质粒、1个质粒品W、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	6.0μL
引物探针	2.0μL
酶	0.5μL
水	11.5μL

计算好各试剂的使用量，加入适当体积离心管中，充分混匀，短暂低速离心，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。

3. 加样（PCR后置）

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、强阳性质粒、质粒品W和抽提阴性对照），同时加5.0μL无酶水作为PCR反应阴性对照。

4 PCR反应（PCRIII型）

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
		64	01:00

荧光信号的收集靶为FAM（2063或2064 A-G突变）、VIC（肺炎支原体）和Ct5（内标），数据的采集是在64℃。在使用ABI7500仪器时，请将“Quencher”栏和“Passive reference”栏均为“none”。

【阳性判断值】

通过临床测试结果分析，利用ROC曲线法最终确定本试剂盒FAM荧光阳性判断值是35.33，VIC荧光的阳性判断值是35.01。

【检测结果的解释】

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，调整质控品W的扩增曲线使其位于阈值线）。阴性对照目的基因应为UNDET或FAM荧光Ct≥35.33、VIC荧光Ct≥35.01，质控品W的目的基因应为UNDET或FAM荧光Ct≥35.33、VIC荧光Ct≥35.01；强阳性质控品为FAM荧光和VIC荧光Ct值均于20.00-25.00之间；弱阳性质控品的FAM荧光和VIC荧光Ct值位于29.00-34.00之间。具体如下：

- 一般情况下，内标的Ct值≤35.00；对其有典型S形扩增曲线但质控基因浓度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。
- 待检样本显示UNDET或无典型S型扩增曲线时，为阴性样本；待检样品FAM荧光（2063或2064 A-G突变）Ct≥35.33、VIC荧光（肺炎支原体）Ct≥35.01或无典型S型扩增曲线时，为阴性样本；
- 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
2063或2064突变（FAM）	肺炎支原体（VIC）	肺炎支原体阳性，无发生A2063G或A2064C耐药突变
Ct≥35.33	Ct<35.01	
Ct<35.33	Ct<35.01	

4、采用本试剂盒进行检测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，不合理的样本采集、运输和处理均有可能导致假阴性结果；检测的靶序列的变异会导致假阴性结果。

5、试剂盒检测扩增曲线及分析示例（见图1）。

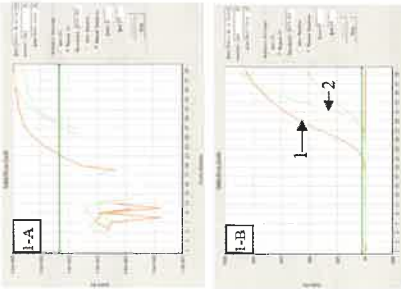


图1：扩增曲线图。图1-A：指数扩增图。图1-B：线性扩增图。图1-C：肺炎支原体阳性样本扩增结果，2063或2064位点没有发生A-G突变，只有VIC荧光的扩增曲线；图1-D：2063或2064位点发生A-G耐药突变的样本的扩增结果，FAM荧光和VIC荧光均有扩增曲线。

【检测方法的特异性】

本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对医生的临床诊断应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等进行综合考虑。样本检测结果和样本收集、处理、运输及保存质量有关，其中任何失误都将导致阴性结果。如果样本处理时没有控制交叉污染，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】

- 以企业内部制定的参品为待检样品，检测结果要求符合以下质量指标：
 - 1.1 阴性参品符合率：8份阴性参品的阳性符合率为8/8；
 - 1.2 阳性参品符合率：9份阳性参品的阳性符合率为9/9。参品MM P1-4检出MP阳性，其中，MM P1-2检出Ct值小于25，MM P3-4检出Ct值位于25-33之间。MM P5-8检出MP及耐药突变阳性，其中，MM P5-6检出Ct值小于25，MM P7-8检出Ct值位于25-33之间；MMP9检出肺炎阳性，Ct值小于33。
 - 1.3 最低检测限参品检出要求：最低检测限参品MM2063和MM2064 L1-L2应完全检出肺炎支和耐药阳性，L3可检出肺炎支和耐药阳性，可检出肺炎支和耐药阴性；其中L1对应靶基因拷贝数为50000拷贝/mL，L2对应靶基因浓度为5000拷贝/mL，L3对应靶基因浓度为500拷贝/mL。
 - 1.4 批内精密度参品检测要求：精密参品进行10次重复检测，Ct值的变异系数CV≤5%；
 - 1.5 PCR反应阴性对照应无扩增，即仪器检测结果不显示Ct值或FAM荧光Ct≥35.33。VIC荧光Ct≥35.01或无典型S型扩增曲线；

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 质控品W应无扩增性，即仪器检测结果不显示Ct值或FAM荧光Ct≥35.33、VIC荧光Ct≥35.01或无典型S型扩增曲线；

1.9 按相应的实验规范操作，内标（Ct5）的Ct值应≤35。

2、检测的肺炎支原体类型包括8种基因型（1a-1e、2a-2c）；2063和2064位点野生型、A2063T、A2067G和C2617G突变对试剂盒检测无干扰。

3、分析性能显示，试剂盒检测靶基因Ct值大于34左右时，10次重复不能100%检出阳性；回收试验结果显示，回收前检测试剂盒Ct的变异系数在5%以内，表明试剂盒准确度高。

4、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，本试剂盒的检测灵敏度以及特异度均达90%以上。

5、与感染部位相同或感染部位相似的其他病原体（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、乙肝病病毒、丙肝病病毒、衣原体、链球菌、金黄色葡萄球菌和肺炎球菌）无交叉反应。

6、当添加干扰物质如血液、尿液、肺炎治疗药物阿莫西林、罗红霉素和阿奇霉素在检测样本中浓度分别是10%、5%、0.2g/L⁻¹、0.03g/L⁻¹和0.15g/L⁻¹时，不会影响对本试剂盒检测结果的判断。

7、突变酶估测比例及所需的核酸浓度如下表所示。

核酸来源	2063位点突变酶比例	2064位点突变酶比例	备注
2pg/μL	1%	0.01%	核酸浓度为2pg/μL，与2064G突变所占比例为100%的情况相比，A2064G突变所占比例为31%及更低比例时，FAM荧光扩增曲线受到抑制，但仍可检出，需做进一步验证。
1pg/μL	5%	0.1%	无
0.2pg/μL	10%	5%	无
0.001pg/μL	未进行实验	10%	无

【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DNAse的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常更换）、一次性消毒进口200μL PCR管（或96孔PCR板加光学盖膜）、移液器头（带喷嘴封式），不能用手直接接触反应管。

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。实验中的有毒有害标本及试剂应妥善放置，专人负责；废弃物应置于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70%乙醇法消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后做紫外灯处理。

4、离心管盖试剂在使用前应充分黏化，混匀，离心管盖，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涡流混合器上进行，不用移液器吹打，免产生气泡，反应体系配完后低速离心数秒，试剂盖需在保膜期使用，不同批号的试剂请勿混用。

【参考文献】

[1]Zhou Y, Zhang Y, Zhang L, Shen Z, Chen Z, Chen Z. More Complications Occur in Macrolide-Resistant than in Macrolide-Sensitive Mycoplasma pneumoniae Pneumonia. Antimicrobial Agents and chemotherapy 2014;58:1034-1038.

[2] Liu X, Jiang Y, Chen X, Li J, Shi D, Xin D. Drug Resistance Mechanisms of Mycoplasma pneumoniae to Macrolide Antibiotics. Bioket research international 2014;2014.

[3]Ye Y, Li Y, Ren T, Liu K. Mycoplasma pneumoniae 23S rRNA Gene Mutations and Mechanisms of Macrolide Resistance. Lab Medicine 2013;44:63-68.

[4] J. WENDELIN DORIGO-ZETISMA, JACOB DANKEBT, AND SEBASTIAN A. J. ZAT. Genotyping of Mycoplasma pneumoniae Clinical Isolates Reveals Eight PT Subtypes within Two Genomic Groups. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 2009; 38(9): 965-970.

[5] Maass V, Kern JM, Poockl 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):3881-2.

[6] Hsieh YC, Tsao KC, Huang CG, et al. Life-threatening Pneumonia Caused by Macrolide-resistant Mycoplasma pneumoniae. Pediatr Infect Dis J. 2011, 21. [Epub ahead of print]

[7]Dua J, Nandaadithi A, Sutcliffe N.Mycoplasma pneumoniae infection associated with uveitis: vasculitis mimicking adult-onset Still's disease. Rheumatol Int. 2011, 15. [Epub ahead of print]

[8] Chiang CH, Huang CC, Chan WL, et al. Association between Mycoplasma pneumoniae and increased risk of ischemic stroke: a nationwide study. Stroke. 2011;42(10):2940-3.

【基本信息】

注册/生产企业名称：江苏默乐生物科技有限公司

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20143402242

【说明书修编及修改日期】2022.11.04