

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：肺炎支原体核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】 24 人份 / 盒、48 人份 / 盒。

【预期用途】

本产品用于定性检测人口咽拭子样本中的肺炎支原体核酸。

肺炎支原体(Mycoplasma Pneumoniae, MP)是人类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,有时并发支气管肺炎,称为原发性非典型性肺炎。主要经飞沫传染,潜伏期 2~3 周,发病率以青少年最高。临床症状较轻,甚至根本无症状,若有也只是头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状,但也有个别死亡报道。一年四季均可发生,但多在秋冬时节。本产品对肺炎支原体 DNA 进行检测,可用于临床对肺炎支原体感染的辅助诊断。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 技术,选取肺炎支原体基因组中相对保守的区域,设计特异性引物及探针,在样本核酸提取之后采用荧光 PCR 方法,对临床样本中肺炎支原体进行快速定性检测。

本产品采用裂解法提取肺炎支原体 DNA 模板,然后在 Taq 酶的作用下对靶区域进行扩增,同时利用 Taqman 荧光探针技术实时监测扩增产物的累积。同时本产品采用内标质控体系,用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性,内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

【主要组成成分】

序号	组分	主要组成成分
1	裂解液	聚苯乙烯二乙烯基苯螯合树脂、蛋白酶 K
2	MP PCR 反应液	尿嘧啶-N- 糖基化酶、TaqDNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸、氯化镁、两对引物、两条荧光探针
3	MP 阳性质控品	MP 阳性质粒片段
4	MP 弱阳性质控品	MP 阳性质粒片段
5	MP 阴性质控品	灭菌水
6	MP 内标	内标阳性质粒的溶液

注 1: 不同批次产品之间同一组分不可以相互替换。

注 2: 试剂盒以外必需的设备及材料: 荧光定量 PCR 仪、漩涡振荡器、生物安全柜、迷你离心机、干式恒温仪或水浴锅、移液器及灭菌的吸头、1.5ml 离心管(灭菌)、离心机、PCR 反应管、无粉乳胶手套和磁力架。

注 3: 试剂盒以外需自备的试剂: 无菌生理盐水。使用方法见【检验方法】1.2 内容。

注 4: 内标与靶基因无同源性。

【储存条件及有效期】

试剂盒在-20±5℃下避光保存,有效期为 8 个月。

产品生产日期见标签,失效日期见标签。

开盖稳定性: 开盖后请于 2 个月内使用。

冻融稳定性: 试剂盒冻融 3 次内,试剂盒性能稳定不影响使用。

运输稳定性要求: 采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输,到货后按照-20±5℃条件下保存,产品可稳定保存至产品效期末。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500、Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1.适用样本类型: 口咽拭子。

2.口咽拭子采集:

点燃酒精灯,嘱病人张口暴露咽喉,用培养管内的消毒长棉签以灵敏而轻柔的动作擦拭两侧腭弓和咽、扁桃体上的分泌物。取毕,将试管口在酒精灯火焰上消毒,然后将棉签插入试管(含 1ml 无菌生理盐水)中涮洗,塞紧,密闭送检。

3.样本保存: 样本收集后可立即用于检测。2~8℃条件下保存不超过 24 小时。 -20℃条件下可保存 8 个月。长期保存请置于-70℃条件以下。应避免反复冻融。

4.运输: 运输过程中应采用不易碎的容器装载样本,并且视作潜在的传染源,避免外漏。采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输,避免样本运输途中解冻,影响检测结果。

5.提取核酸的要求: 提取产物浓度范围应为 10ng/μl~100ng/μl; OD260/OD280 的比值在 1.7~1.9 之间。

【检验方法】

1.样本核酸提取

1.1 准备:

取出试剂盒中裂解液, 恢复至室温。

1.2 提取:

- 1) 取 1ml 样品至 1.5ml 离心管中, 12,000rpm 离心 5 分钟, 去上清。
- 2) 加入 1ml 无菌生理盐水(自备)洗涤, 13,000rpm 离心 2 分钟, 去上清, 再重复洗涤 2 次(最后一洗涤去上清液, 建议用移液枪缓慢吸取)。
- 3) 向沉淀中加入裂解液 50μl(裂解液内有不溶颗粒, 取液前请充分混匀), 剧烈震荡 5min。
- 4) 95℃干浴或煮沸 10 分钟, 13,000rpm 离心 5 分钟, 取上清备用。

1.3 质控品: MP 阳性、弱阳性、阴性质控品无需抽提, 使用前室温融化混匀。

2. 试剂配制

2.1 配制说明

检测反应必须设置 MP 阳性质控品, MP 弱阳性质控品和 MP 阴性质控品。

2.2 配制过程

提前 30 分钟将试剂取出, 室温融化, 涡旋振荡 10 秒, 2000 rpm 离心 15 秒备用。

确定反应数 N, N=待检样本数(n)+质控品数(3)。计算各个试剂的量, 见下表:

试剂	MP PCR 反应液	内标模板
体积(μl)	19×N	1×N

取 1.5 ml 离心管(灭菌)配制反应体系, 试剂全部加入后, 涡旋振荡 10 秒, 2000 rpm 离心 15 秒待用。然后将上述混合液 20 μl/管分装至 PCR 反应管中。

3. 加样

将已处理样本及三种质控品各 5μl 分别加入 PCR 反应管中, 盖紧管盖(避免气泡产生), 2000 rpm 离心 15 秒, 将管壁上的液体全部甩至管底, 然后立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增程序设置

4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) 靶基因选择 FAM 通道; 内标选择 VIC 通道。
- 3) 循环参数设置见下表:

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1

3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火、延伸、荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

4.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) 靶基因选择 FAM 通道; 内标选择 HEX 通道。
- 3) 循环参数设置见下表:

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火、延伸、荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

5. 结果分析条件设定

5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后, 根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时, 基线(Baseline)的起始点(Start)设定在 5~8 之间, 终止点(Stop)设定在 12~15 之间, 阈值线(Threshold)通常设定在 1000~5000 之间(视具体情况而定)。设定之后, 点击“Analyze”(分析)按键, 即可从“Report”窗口的“Ct”处得到各样本的 Ct 值。

5.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后, 根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值, 手动调整基线(Non-adaptive baseline)的起始点(Start)一般设定为 5~8, 终止点(Stop)一般设定为 12~15, 阈值线(Threshold fluorescence)通常设定在 500~2000 之间(视具体情况而定)。设定之后, 可以从“Text report”窗口的“Ct(dRn)”处得到各样本的 Ct 值。

6. 质量控制

- 6.1 内标: 内标通道应出现 S 型扩增曲线, 且 Ct 值≤35.0。
- 6.2 阴性质控品: 靶基因通道无 S 型扩增曲线; 内标通道有 S 型扩增曲线, 且 Ct 值≤35.0。
- 6.3 阳性质控品: 靶基因通道有 S 型扩增曲线, 且 Ct 值≤30.0; 内标通道有 S 型扩增曲线, 且 Ct 值≤35.0。
- 6.4 弱阳性质控品: 靶基因通道有 S 型扩增曲线, 且 Ct 值≤35.0; 内标通道均有 S 型扩

增曲线，且 Ct 值≤35.0。

以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效！

【阳性判断值】

本试剂盒的阳性样本参考值为 Ct 值≤37.0；阴性样本无 Ct 值；37.0<Ct 值≤40.0 为灰度区；内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

【检验结果的解释】

- 1.若内标通道没有出现 S 型扩增曲线，则需重复试验，若依旧没有出现 S 型扩增曲线，请联系生产厂家。
- 2.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道无 S 型扩增曲线，则检测样本为 MP 阴性。
- 3.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道有 S 型扩增曲线，则有如下解释：
 - 3.1 若靶基因通道 Ct 值≤37.0，则检测样本为 MP 阳性。
 - 3.2 若 37.0<靶基因 Ct 值≤40.0，需重新提取样本核酸进行检测，若重复检测 Ct 值≤40.0，则检测样本为 MP 阳性。
 - 3.3 若靶基因 Ct 值≤15.0 而又出现不规则曲线，建议重新提取样本核酸或对样本核酸进行一定梯度稀释再进行检测。具体方法见本说明书的样本处理。

【检验方法的局限性】

当检测样本被检核酸浓度含量低于最低检测限时可能会有阴性结果，阴性结果仅能说明低于本试剂盒检测限值，不能完全排除感染的可能，此时建议采用其他方法进一步确认。

【产品性能指标】

- 1.本试剂盒的最低检出限为 4.0×10^2 copies/ml。
- 2.分析特异性：
 - 2.1 其他支原体如解脲支原体、人型支原体和生殖支原体对本试剂盒无干扰。
 - 2.2 对于可能存在检测干扰的非支原体如肠道病毒、肠道病毒 71 型、呼吸道合胞病毒、鸟分枝杆菌、龟分枝杆菌、草分枝杆菌、副流感病毒、流感病毒、沙眼衣原体、结核分枝杆菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、嗜肺军团菌、肺炎衣原体、腺病毒、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、百日咳杆菌、金黄色葡萄球菌、柯萨奇病毒 A16 型、短小棒状杆菌和大肠杆菌检测结果均为阴性。
- 3.抗干扰物质：对于可能存在检测干扰的含粘蛋白、红霉素阳性样本，检测结果均为阳性。

- 4.阳性参考品符合率：检测企业阳性参考品（P1~P8），阳性符合率为 8/8。
 - 5.阴性参考品符合率：检测企业阴性参考品（N1~N8），阴性符合率为 8/8。
 - 6.最低检出限参考品符合率：重复检测企业最低检出限参考品（L）10 次，阳性符合率为 10/10。
 - 7.精密度参考品符合率：重复检测企业精密度参考品（J1 和 J2）10 次，阳性符合率均为 10/10，Ct 值的变异系数 CV 均≤5%。
- 【注意事项】**
- 1.实验前请仔细阅读本说明书。
 - 2.在生物安全柜内进行试剂和样本准备，实验中穿工作服，戴口罩和一次性手套，使用自卸管式移液器。
 - 3.样本制备区内的生物安全柜、超净台、加样器、离心机及其他设备都应使用 10%次氯酸钠溶液消毒，然后用实验室三级水或 70%乙醇洗涤去除残留的的次氯酸钠。
 - 4.本试剂盒需-20±5℃冷冻保存，试剂使用前要完全解冻，避免反复冻融。
 - 5.为使实验室工作区被扩增产物污染的可能性降到最低，实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训。
 - 6.所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。对每次实验进行质量控制。移液器须定期校准。
 - 7.样本制备区所用过的吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。
 - 8.工作完后必须定期对实验室采取有效的去污染措施。
 - 9.不同批号试剂盒中各组分不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒，不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。
 - 10.本产品仅用于体外诊断。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断医疗器械



查阅使用说明

第 2 次核准及修改日期：2021 年 03 月 01 日

【参考文献】

- [1] Talkington D F, Thacker W L, Jensen J S, et al. Diagnosis of Mycoplasma pneumoniae Infection in Autopsy and Open-Lung Biopsy Tissues by Nested PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 1998, 36(4): 1151-1153.
- [2] Sharma S, Brousseau R and Kasatiya S. Detection and Confirmation of Mycoplasma pneumoniae in Urogenital Specimens by PCR [J]. Journal of clinical microbiology, 1998, 36(1): 277-280.
- [3] Kong FanRong, Gordon S and Gilbert G. Rapid-Cycle PCR for Detection and Typing of Mycoplasma pneumoniae in Clinical Specimens [J]. Journal of clinical microbiology, 2000, 38(11): 4256-4259.
- [4] 钱庆辉. 小儿肺炎支原体肺炎的临床特点和诊治分析[J]. 中国医药导刊, 2012, 14(7): 1107-1109.
- [5] 黄开明, 杨波. 肺炎支原体肺炎的诊断以及治疗研究进展[J]. 中外医学研究, 2012, 10(4): 159-160.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

联系方式：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系方式：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

网址：www.bioresource.com.cn

生产许可证编号：京药监械生产许 20120027 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400489

【说明书核准及修改日期】

第 1 次核准及修改日期：2016 年 03 月 12 日