

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

【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儿童痰液样本中肺炎支原体及其抗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、肺脓疡、免疫性溶血性贫血、脑膜脑炎、心肌炎、心包炎、肾炎、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。肺炎支原体耐药株感染患者的发热持续时间、住院时间及给药后发热持续时间均显著长于敏感株感染患者。^[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，从而使肺炎支原体产生耐药性。^[2]目前已发现的突变位点包括 2063、2064、2067 和 2617。^[2]其中，A2063G 表现为对 14-环大环内酯类抗生素耐药，A2064G 表现为 14-和 16-环大环内酯类抗生素耐药，C2617G 表现为 14-和 15-环大环内酯类抗生素耐药，A2067G 表现为交沙霉素抗性。^[3]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。^[4]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 种基因亚型（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的 8 个基因亚型。^[4]

临床或实验室诊断肺炎支原体检测方法有酶联免疫法和分离培养法，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设施及防护程序。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 荧光探针技术对人痰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 CY5 荧光标记。强阳性质控品和弱阳性质控品，包含 P1 基因序列和 23S rRNA A2063G 发生突变的基因序列，质控品 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：

序号	标签	成分	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 突变位点的引物和探针等	1 管（40μL/管）
3	酶	含 DNA 聚合酶和尿嘧啶糖基化酶	1 管（10μL/管）
4	强阳性质控品	含 P1 基因序列和 23S rRNA A2063G 发生突变的基因序列	1 管（500μL/管）
5	弱阳性质控品	含 P1 基因序列和 23S rRNA A2063G 发生突变的基因序列	1 管（500μL/管）
6	质控品 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 (200 μ L/管)
8	水	水	1 管 (1mL/管)

备注:

1. 本试剂盒配套使用的核酸抽提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), 注册号是陕西食药监械(准)字 2011 第 1400125 号。

【储存条件及有效期】

-20℃避光密闭保存, 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℃避光条件下暂存时间不宜超过5天, 超过5天检测结果不稳定; 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, 应避光密闭保存于-20℃。

生产日期或失效日期见试剂盒外标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 Stratagene 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如支原体肺炎、支气管炎、肺脓疡、免疫性溶血性贫血、脑膜脑炎、心肌炎、心包炎、肾炎、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3天内采集, 请患者先用清水漱口, 深呼吸并屏气5秒钟, 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5次后会降解, 如果不能确保-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8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、发病日期和标本采集日期。

抽提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)。

【检验方法】

1 样品处理 (PCR II 室)

样本处理请参照核酸抽提试剂盒说明书进行, 请在样本处理过程中, 在添加样本时, 同时加入内标, 按照5 μ L/人份的量进行添加。MM强阳性质控品和MM弱阳性质控品与样本进行平行处理。采用生理盐水作为阴性抽提对照。

2 扩增试剂准备 (PCR I 室)

从试剂盒中取出缓冲液、引物探针和水在冰上或4℃融化, 取出酶, 轻微摇晃混匀并低速简短离心。取出1个无菌无核酸酶的离心管, 做好标记, 每人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个阳性质控、1个质控品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	6.0 μ L
引物探针	2.0 μ L
酶	0.5 μ L
水	11.5 μ L

计算好各试剂使用量, 加入适当体积离心管中, 充分混匀, 简短低速离心, 向设定的荧光定量PCR反应管或96孔板中分别加入20.0 μ L, 转移至样本处理区。

3 加样 (PCR II 室)

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、强弱阳性质控、质控品W和抽提阴性对照），同时加5.0μL无菌水作为PCR反应阴性对照。

4 PCR反应（PCRⅢ室）

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

荧光信号的收集定为FAM（2063或2064 A:G突变）、VIC（肺炎支原体）和CY5（内标），数据的采集定在64℃。在使用ABI7500仪器时，请将“Quencher”栏和“Passive reference”栏选为“none”。

【阳性判断值】

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

【检验结果的解释】

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的扩增曲线使其低于阈值线）。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；强阳性质控品的FAM荧光和VIC荧光Ct值均位于20.00-25.00之间；弱阳性质控品的FAM荧光和VIC荧光Ct值均位于29.00-34.00之间。具体如下：

- 1、一般情况下，内标的 Ct 值≤35.00；对具有典型 S 扩增曲线但因靶基因浓度过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。
- 2、待检样本显示 UNDETECT 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；
- 3、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）	
Ct ≥35.33	Ct <35.01	肺炎支原体阳性，未发生 A2063G 或 A2064G 耐药突变）
Ct <35.33	Ct <35.01	肺炎支原体阳性，发生 A2063G 或 /和 A2064G 耐药突变

- 4、采用本试剂盒进行检验得到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、试剂盒检测扩增图及分析示例（见图 1）。

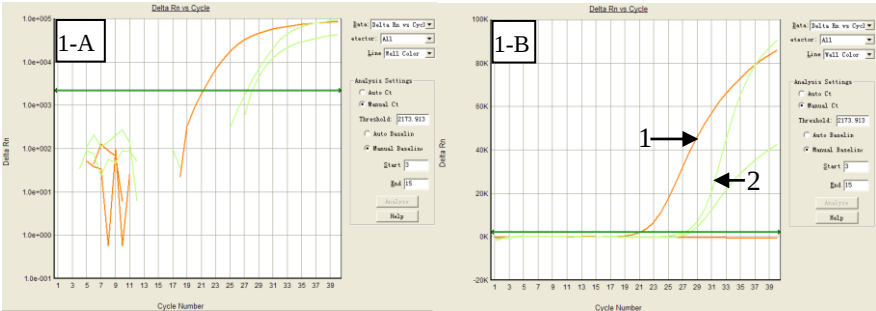


图 1：扩增曲线图示。图 1-A：指数扩增图。图 1-B：线性扩增图，“1”：肺炎支原体阳性样本扩增结果，2063 或 2064 位点没有发生 A:G 突变，只有 VIC 荧光的扩增曲线；“2”：2063 或 2064 位点发生 A:G 耐药突变的样本的扩增结果，FAM 荧光和 VIC 荧光均有扩增曲线。

【检验方法的局限性】

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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将导致假阴性结果。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】

- 1、以企业内部制定的参考品为待检样品，检测结果要求符合以下质量标准：
 - 1.1 阴性参考品符合率：8 份阴性参考品的阴性符合率为 8/8；
 - 1.2 阳性参考品符合率：9 份阳性参考品的阳性符合率为 9/9。参考品 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 最低检测限参考品检出要求：最低检测限参考品MM2063和MM2064 L1-L2应完全检出肺炎和耐药阳性，L3可检出肺炎和耐药阳性，可检出肺炎和耐药阴性；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 批内精密性参考品检测要求：精密性参考品进行10次重复检测，Ct值的变异系数CV≤5%；
 - 1.5 PCR反应阴性对照检出应为阴性，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；
 - 1.6 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检出应为阴性，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（CY5）的Ct值应≤35。
- 2、检测的肺炎支原体亚型包括8种基因亚型（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，回收前后检测结果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、与感染部位相同或者感染症状相似的其他病原体（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、乙肝病毒、丙肝病毒、肺炎衣原体、链球菌、金黄色葡萄球菌和肺炎球菌）无交叉反应。
- 6、当常见干扰物质如血液、脓液、肺炎治疗用药物阿莫西林、罗红霉素和阿奇霉素在检验样本中浓度分别是 10%、5%、0.2g•L⁻¹、0.03g•L⁻¹ 和 0.15g•L⁻¹ 时，不会影响到对样本检测结果的判断。
- 7、突变最低检测比例及所需的核酸浓度如下表所示。

核酸浓度	2063 位点突变最低比例	2064 位点突变最低比例	备注
2pg/ μ L	1%	0.01%	核酸浓度为 2pg/ μ L，与 A2064G 突变所占比例为 100%的情况相比，A2064G 突变所占比例为 1%及更低比例时，FAM 荧光的扩增曲线受抑制明显，但仍有 Ct 值可读出，易被判为假阴性。
1pg/ μ L	5%	0.1%	无
0.2pg/ μ L	10%	5%	无
0.001pg/ μ L	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、荧光检测和结果分析。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 DNA 和 Dnase 的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性薄壁进口 200μL PCR 管（或 96 孔 PCR 板加光学贴膜）、移液器头（带滤嘴自卸式），不能用手直接触摸反应管。
- 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。实验中的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置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/或 70%乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。
- 4、离心管装试剂在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，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漩涡混合器上进行，不用移液器吹打，免产生气泡，反应体系配制完毕低速离心数秒。试剂盒请在保质期内使用。不同批号的试剂请勿混用。

【参考文献】

- [1]Zhou Y, Zhang Y, Sheng Y, Zhang L, Shen 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. BioMed research international 2014;2014.
- [3] Ye Y, Li S, 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-ZETSMA, JACOB DANKERT, AND SEBASTIAN A. J. ZAAT. Genotyping of Mycoplasma pneumoniae Clinical Isolates Reveals Eight P1 Subtypes within Two Genomic Groups. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, 2000, 38(3): 965-970.
- [5] Maass V, Kern JM, Poeckl 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):3681-2.
- [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, Nandagudi A, Sutcliffe N.Mycoplasma pneumoniae infection associated with urticarial 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 pneumonia and increased risk of ischemic stroke: a nationwide study.Stroke. 2011,42(10):2940-3.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏默乐生物科技股份有限公司

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

售后服务单位名称：江苏默乐生物科技股份有限公司

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

【说明书批准及修改日期】2022.06.09