

支原体检测试剂盒 (荧光-PCR 法) 性能验证报告

一、介绍

此份报告数据为北京阅微基因技术股份有限公司支原体检测试剂盒 (荧光-PCR 法) 的性能验证结果总结。本数据仅供客户参考, 本公司还可提供详细版验证报告, 如使用详细版报告则只需进行方法适用性验证 (检测限和特异性验证)。

二、实验目的

本实验依据《中国药典》及《欧洲药典》相应章节, 对荧光-PCR 法检测支原体 DNA 进行检测限、特异性、稳定性等性能验证并与药典推荐方法进行一致性比较。

三、参考依据

《中国药典》2020 版四部 9201, 药品微生物检验替代方法验证指导原则。

《欧洲药典》9.0-2.6.7 Mycoplasmas。

四、实验材料

4.1 主要仪器

仪器	制造商	型号
qPCR 扩增仪	赛默飞	Q6
qPCR 扩增仪	赛默飞	7500
PCR 扩增仪	赛默飞	Verti DX96
紫外分光光度计	赛默飞	NanoDrop2000
高速离心机	赛默飞	LegendMicro17

4.2 主要试剂:

试剂	厂家	规格
支原体检测试剂盒 (荧光-PCR 法)	阅微基因	50 次/盒

4.3 标准灭活菌株:

菌株名称	编号	来源, 货号/批号
肺炎支原体	ATCC23714	MB, 103-4003
口腔支原体	ATCC15531	MB, 103-2003
猪鼻支原体	ATCC17981	MB, 103-7003
莱氏无胆支原体	ATCC23206	MB, 103-8003
滑液支原体	ATCC25204	MB, 103-5003
鸡毒支原体	ATCC19610	MB, 103-3003
肺炎链球菌	BNCC338425	BNCC, 230508
梭状芽胞杆菌	BNCC194606	BNCC, 230506

五、验证内容及结果

5.1 灵敏度与检测限

样本分组	浓度	阳性组数量/总组数
肺炎支原体	10 CFU/ml	24/24
口腔支原体	10 CFU/ml	24/24
猪鼻支原体	10 CFU/ml	24/24
莱氏无胆支原体	10 CFU/ml	24/24
滑液支原体	10 CFU/ml	24/24
鸡毒支原体	10 CFU/ml	24/24

结果表明:使用本检测体系检测各支原体标准株 10 CFU/ml 浓度, 检出比例均可达到 100% (24/24)。

5.2 专属性与特异性

使用 PBS, 不同浓度胎牛血清等, 对支原体检测试剂均无干扰。选取 7 种其他物种 DNA(金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、黑曲霉菌、铜绿假单胞菌、生孢梭

菌、枯草芽孢杆菌、大肠埃希菌), 2种 10-100 CFU/mL 菌株(肺炎链球菌、梭状芽孢杆菌)与支原体检测试剂无交叉反应。

样本分组	通道	CT 值
金黄色葡萄球菌	FAM	Undetermined
白色念珠菌	FAM	Undetermined
黑曲霉菌	FAM	Undetermined
铜绿假单胞菌	FAM	Undetermined
生孢梭菌	FAM	Undetermined
枯草芽孢杆菌	FAM	Undetermined
大肠埃希菌	FAM	Undetermined
66 CFU/mL 梭状芽孢杆菌	FAM	Undetermined
90 CFU/mL 肺炎链球菌	FAM	Undetermined
5% 胎牛血清培养基	FAM	Undetermined
10% 胎牛血清培养基	FAM	Undetermined
20% 胎牛血清培养基	FAM	Undetermined
30% 胎牛血清培养基	FAM	Undetermined
PBS	FAM	Undetermined
阳性质控品	FAM	18.035
NTC	FAM	Undetermined

5.3 稳定性

不同提取方法对支原体检出无影响。

提取方法	CT 值	RSD
10 CFU/mL 支原体标准株 进口试剂盒提取	36.197	1.85%
	37.200	
	36.406	
	37.801	
	37.440	
10 CFU/mL 支原体标准株	36.086	1.23%

渗透压法提取	35.807	
	36.620	
	36.335	
	35.488	
10 CFU/mL 支原体标准株 柱提取	34.818	0.26%
	34.818	
	34.975	
阳性对照 (P)	19.514	--
NTC	Undetermined	--

不同实验仪器对支原体检出无影响。

样本分组	机型		RSD
	7500	Q6	
10 CFU/mL 支原体标准株	34.402	34.646	1.27%
10 CFU/mL 支原体标准株	34.549	34.949	
10 CFU/mL 支原体标准株	34.299	35.054	
10 CFU/mL 支原体标准株	35.319	35.533	
10 CFU/mL 支原体标准株	33.772	34.354	
内部质控 (I)	24.440	23.874	-
阳性对照 (P)	18.707	18.908	-
NTC	Undetermined	Undetermined	-
NTC	Undetermined	Undetermined	-
NTC	Undetermined	Undetermined	-

不同实验员对支原体检出无影响。

样本分组	操作人		RSD
	操作人员 1	操作人员 2	
10 CFU/mL 支原体标准株	34.402	33.575	2.74%
10 CFU/mL 支原体标准株	34.549	33.236	

10 CFU/mL 支原体标准株	34.299	35.933	
10 CFU/mL 支原体标准株	35.319	35.940	
10 CFU/mL 支原体标准株	33.772	35.115	
内部质控 (I)	24.440	24.977	--
阳性对照 (P)	18.707	18.658	--
NTC	Undetermined	Undetermined	--
NTC	Undetermined	Undetermined	--
NTC	Undetermined	Undetermined	--

试剂盒初次解冻使用后于室温（25 摄氏度）或 4 摄氏度避光存放 100 天，试剂性能不受影响， $CV_{25^{\circ}\text{C}, 65\text{days}}=4.13\%$ 。

5.4 一致性评价

与药典支原体培养法进行平行验证，支原体检出结果一致。

样本分组	支原体检测（荧光-PCR 法）	药典培养法
支原体阳性样本	37.790	阳性
支原体阳性样本	37.108	阳性
阳性对照 (P)	21.001	--
内部质控 (I)	23.376	--
NTC	未检出	阴性