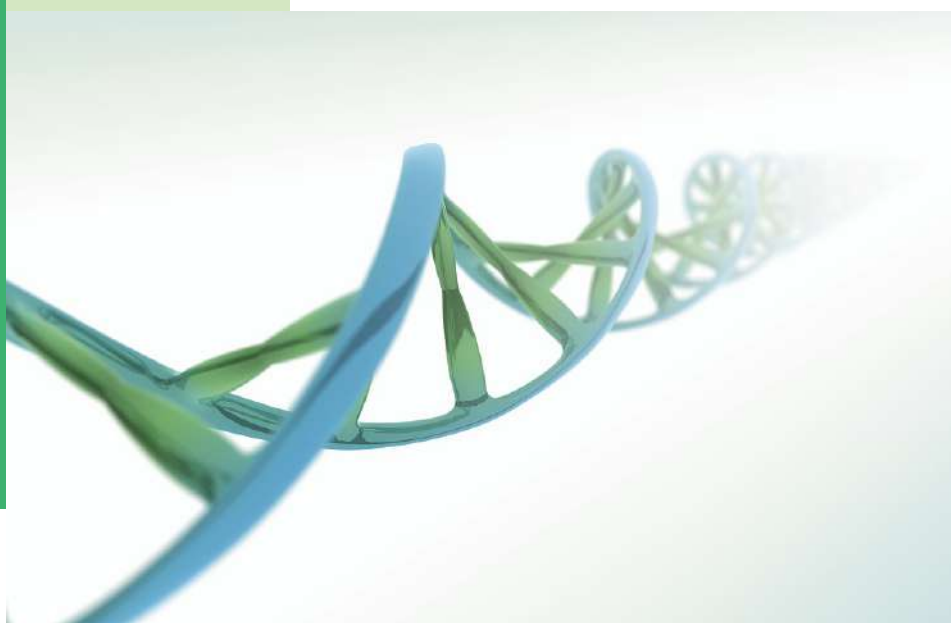




湖州申科



支 *Mycoplasma*  
原体测定  
参考指南



# 前言

## 生物制品

生物制品是指以微生物、细胞、动物或人源组织和体液为起始原材料，用生物学技术制成的用于预防、治疗和诊断人类疾病的制剂，如疫苗，血液制品，生物技术药物，微生态制剂、免疫调节剂、诊断制品等。

生物制品的生产中常用到动物细胞基质。在细胞培养过程中，支原体感染发生率很高。当细胞被支原体感染后，细胞内的DNA、RNA及蛋白表达发生改变，而细胞的生长一般并未发生显著的改变，因而支原体污染难以察觉。各国药典和药品监管法规对生物制品生产中的支原体检查都作出了明确规定。

## 支原体（柔膜细菌类生物的简称）

最小的自由生物，是哺乳动物细胞培养物中的常见污染物。

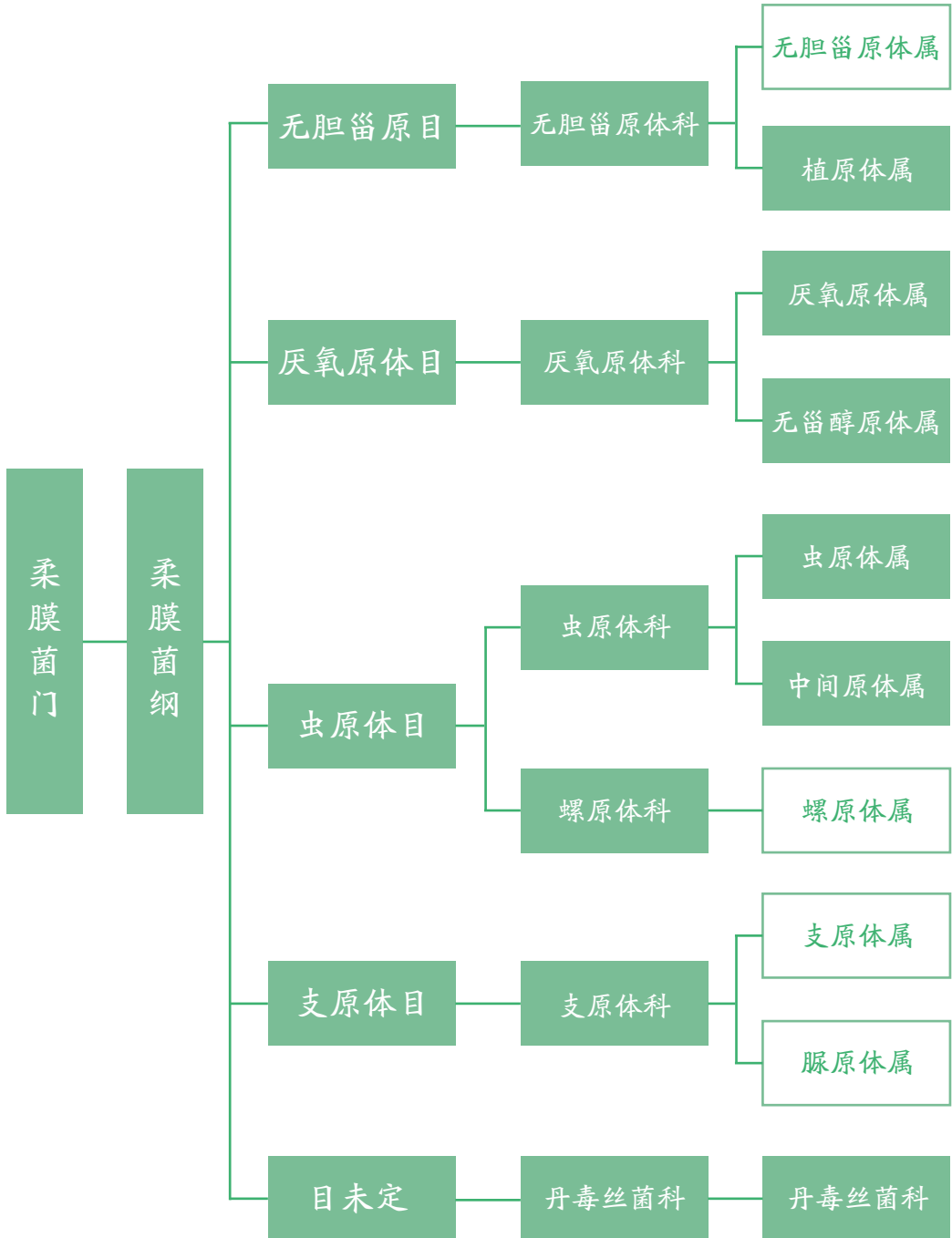
支原体种类广泛，包括250多种。它们的宿主范围很广，涵盖了人类和其他动物，包括鸟类，爬行动物，鱼类和哺乳动物以及昆虫和植物。

支原体对宿主细胞营养的先天依赖性，以及它们在自然界中的广泛分布，能够通过抗菌过滤器使其在受感染细胞中隐蔽生长，成为污染细胞底物的可怕存在。

通常，支原体污染对涉及细胞源性生物和药物产品的开发和生产的生物医学研究实验室和设施是一个严重的问题。



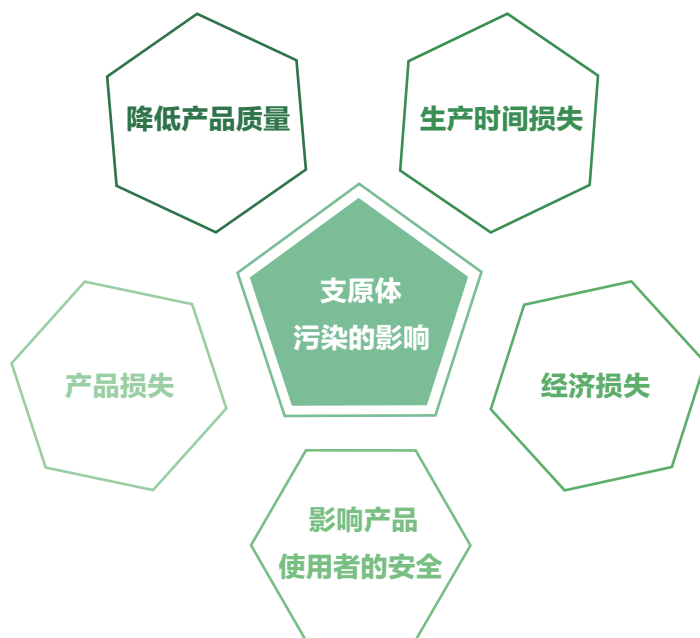
## △ 支原体分类



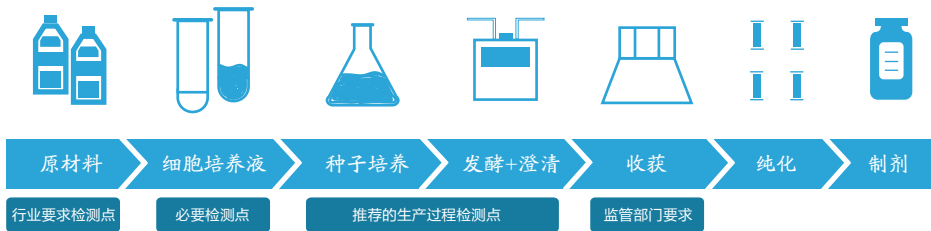
\* 标注的微生物属与生物制药产品的生产过程具有相关性

**支**原体介于细菌和病毒之间，可在无生命培养基中生长繁殖的最小原核细胞型微生物，形态结构类似于细菌，但比细菌要小的多，且没有细胞壁，大小在0.1-0.8 $\mu\text{m}$ ，所以支原体很容易通过标准灭菌过滤器，随培养基或原料添加剂一起进入细胞培养过程或别的生物制品中。而且一旦污染支原体，由于支原体含有多个质粒，质粒与转座子共同编码产生抗药性，导致支原体对抗菌药物的耐药性，因此很难去除，很多时候只能全部废弃，增加企业成本。

支原体污染对生物制品产生的影响



需要检测的生物制品包括病毒疫苗，单克隆抗体，免疫调节剂，细胞因子，生长因子，细胞治疗产品等。



### \* 传统生物制药

对于疫苗和其他生物细胞衍生产品的安全性和纯度很重要，要确保用于生产这些产品的细胞底物和未加工的散装材料不含诸如支原体在内的不定成分



### \* 细胞产品制备（包括干细胞和疫苗等）

在传统生物制药和细胞生产过程中，可能经常会出现如下表中出现的支原体，从而引起支原体污染，导致产品出现各种各样的问题，影响产品质量，造成企业损失。

支原体种类	主要来源	已发表报告提到的 常见细胞培养污染物	潜在污染源
莱氏无胆甾原体	牛、猪 禽类、植物	是	其他细胞系 牛血清、培养基
精氨酸支原体	牛、绵羊 山羊、猪	是	其他细胞系 牛血清
牛支原体	牛	是	其他细胞系 牛血清
发酵支原体	人	是	其他细胞系、人
鸡毒支原体	禽类	是	其他细胞系、鸡胚
猪鼻支原体	猪	是	其他细胞系 猪胰蛋白酶
口腔/唾液支原体	人	是	其他细胞系、人
滑液囊支原体	禽类	是	其他细胞系、鸡胚
螺原体	植物	是	其他细胞系

\* 常见支原体污染来源

## 法规要求

### 《中国药典》2015版3301 支原体检查法

主细胞库、工作细胞库、病毒种子批、对照细胞以及临床治疗用细胞进行支原体检查时，应同时进行培养法和指示细胞培养法（DNA染色法）。病毒类疫苗的病毒收获液、原液采用培养法检查支原体，必要时，亦可采用指示细胞培养法筛选培养基。也可采用经国家药品检定机构认可的其他方法。

生物制品生产检定用动物细胞基质制备及检定规程（四）中细胞检定明确要求进行支原体检查：取细胞培养上清液样品，依法检查；人用重组单克隆抗体制品总论中要求对细胞培养和收获液进行支原体检查。





## 国家药监局发布细胞治疗产品研究与评价 技术指导原则的通告（2017年第216号）

研究者需建立细胞治疗产品的质量控制在策略。建议采用中间样品的质量检验和终产品放行检验相结合的机制。检定项目应当建立在产品质量研究以及对生产工艺和生产过程充分理解的基础之上，同时兼顾产品的特性和当下的科学认知与共识。

随着研究的不断深入（如从临床前阶段进行至临床阶段），工艺相关信息应逐渐获得累积，检验方法应逐步完善，以适应各阶段质量控制要求，建议确证性临床试验用样品的质量控制与商业化生产时的质控要求保持一致。质量控制一般应考虑鉴别、生物学效力、纯度、杂质、细胞数量（活细胞数、功能细胞数等）和一般检测（如无菌、支原体、内毒素、外观、除细胞之外的其他外源性异物等）等。验收标准制订应以临床前研究批次、临床研究批次和验证批次中检测获得的数据，以及其他相关数据（如经验、文献报道和稳定性研究等）确定。

当放行检验受到时间限制时，可考虑加强工艺过程中的样品质量监控，将过程控制与放行检验相结合，通过过程控制简化放行检验。以上操作应经过研究与验证，并附有相应的操作规范。建议尽量在产品临床应用前完成全部放行检验，当有些放行检验结果有可能后置时，应对可能出现的非预期检验结果制订处置方案。为对产品进行回顾性分析或进一步分析，建议研究者根据产品自身的特点，并参照《**药品生产管理规范**》中的要求进行留样备查。

放行检验用方法应经过研究与验证，特别是对于建立的新方法应进行全面的验证，对于药典中收录的方法应进行适用性的验证。对于有效期短和样本量小的产品，可采用快速、微量的新型检测方法。研究者应对新型检验方法与传统检测方法进行比较和评估，必要时，在产品放行检验时可以采用两种检验方法进行相互验证。



## 《CFR610.30》

按照CFR中关于生物制品的规定，应测试用于制造人类生物制品的细胞系中是否存在可检测的微生物制剂（包括支原体）。除了主细胞库和工作细胞库，还应测试任何对照细胞和生产末期细胞，以及主病毒和工作病毒种子。

对于生产批次，应在最有可能检测到任何支原体不定因子的阶段（即未加工的散装物料，而不是已加工的散装物料或最终产品）进行测试。CFR610.30中的支原体测试规定，活病毒疫苗应在澄清或过滤之前进行测试，灭活病毒疫苗应在灭活前进行测试。

具体说明如下：

Except as provided otherwise in this subchapter, prior to clarification or filtration in the case of live virus vaccines produced from in vitro living cell cultures, and prior to inactivation in the case of inactivated virus vaccines produced from such living cell cultures, each virus harvest pool and control fluid pool shall be tested for the presence of Mycoplasma, as follows: Samples of the virus for this test shall be stored either (1) between 2 and 8 °C for no longer than 24 hours, or (2) at -20 °C or lower if stored for longer than 24 hours.

The test shall be performed on samples of the viral harvest pool and on control fluid pool obtained at the time of viral harvest, as follows: No less than 2.0 ml. of each sample shall be inoculated in evenly distributed amounts over the surface of no less than 10 plates of at least two agar media. No less than 1.0 ml. of sample shall be inoculated into each of four tubes containing 10 ml. of a semisolid broth medium.

The media shall be such as have been shown to be capable of detecting known Mycoplasma and each test shall include control cultures of at least two known strains of Mycoplasma, one of which must be *M. pneumoniae*. One half of the plates and two tubes of broth shall be incubated aerobically at 36 °C ±1°C and the remaining plates and tubes shall be incubated anaerobically at 36 °C ±1 °C in an environment of 5-10 percent CO<sub>2</sub> in N<sub>2</sub>.

Anaerobic incubation shall be for no less than 14 days and the broth in the two tubes shall be tested after 3 days and 14 days, at which times 0.5 ml. of broth from each of the two tubes shall be combined and subinoculated onto no less than four additional plates and incubated anaerobically.

All inoculated plates shall be incubated for no less than 14 days, at which time observation for growth of Mycoplasma shall be made at a magnification of no less than 300× . If the Dienes Methylene Blue-Azure dye or an equivalent staining procedure is used, no less than a one square cm. plug of the agar shall be excised from the inoculated area and examined for the presence of Mycoplasma.

The presence of the Mycoplasma shall be determined by comparison of the growth obtained from the test samples with that of the control cultures, with respect to typical colonial and microscopic morphology. The virus pool is satisfactory for vaccine manufacture if none of the tests on the samples show evidence of the presence of Mycoplasma.



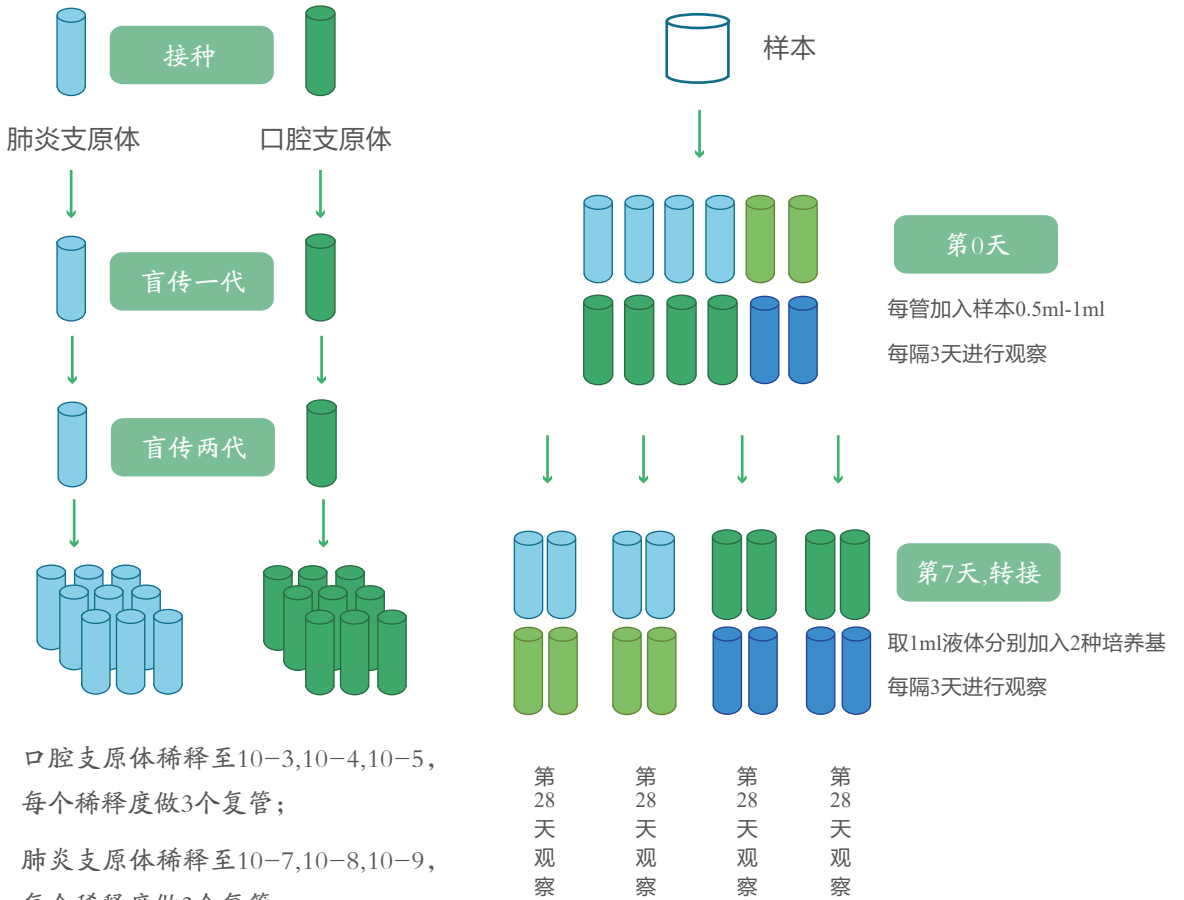
# 培养法

培养法作为支原体检测的金标准，在中国药典，欧洲药典、日本药典和美国药典中都是作为基本的检测方法而使用。

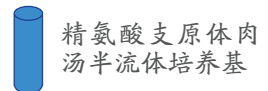
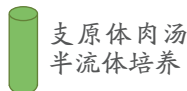
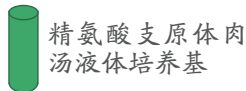
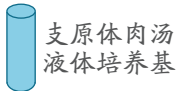
药典	要求	相同点	不同点
中国药典	主细胞库、工作细胞库、病毒种子批、对照细胞以及临床治疗用细胞，病毒类疫苗的病毒收获液、原液用培养法检测	都要2种培养基，检测前都做培养基灵敏度检查，培养条件相同，检测时间均不少于28天	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 需要2种阳性对照（肺炎支原体和口腔支原体）；</li> <li>· 做培养基灵敏度时口腔支原体达到<math>10^{-4}</math>，肺炎支原体达到<math>10^{-8}</math>要求</li> <li>· 样本检测时取0.5ml-1ml至10ml培养基中培养。</li> </ul>
欧洲药典	主细胞库、工作细胞库、病毒种子批或对照细胞，病毒收获液、批量疫苗或最终批次用培养法检测		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 至少需要1种阳性对照；</li> <li>· 做培养基灵敏度时，加入的支原体小于100CFU；</li> <li>· 需做样本适用性验证；</li> <li>· 样本检测时取10ml至100ml培养基中培养</li> </ul>
日本药典	主细胞库、工作细胞库以及生产过程中的细胞培养用培养法检测		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 至少需要2种阳性对照；</li> <li>· 做培养基灵敏度时，加入的支原体小于100CFU；</li> <li>· 样本检测时取10ml至100ml培养基中培养。</li> </ul>
美国药典	用于生产测试品、消化液或任何其他疑似支原体污染的材料测试品、组织和细胞培养物用培养法检测		<ul style="list-style-type: none"> <li>· 至少需要2种阳性对照；</li> <li>· 做培养基灵敏度时，加入的支原体小于100CFU（或者CCU）；</li> <li>· 需做样本适用性验证；</li> <li>· 样本检测时取10ml至100ml培养基中培养。</li> </ul>

\* 不同国家药典支原体培养法的检测要求

# △ 按照中国药典中培养法的检测流程而设计的支原体检测方案：



## 培养基灵敏度检查



## 培养法检查

### 培养基灵敏度结果示例

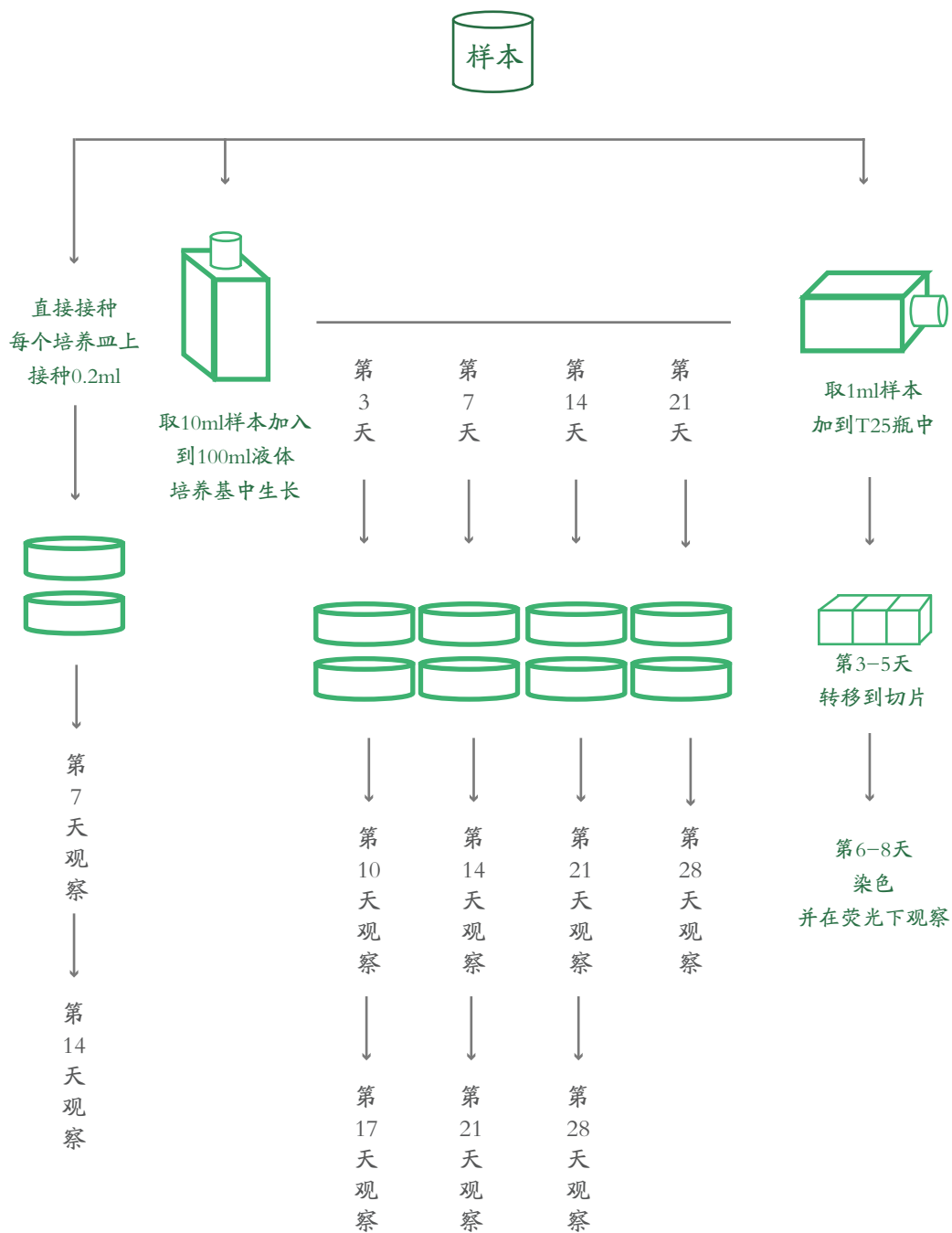


\*口腔支原体培养基灵敏度达到 $10^{-4}$



\*肺炎支原体培养基灵敏度达到 $10^{-8}$

△ 按照EP/JP/USP/PTC中支原体检测的检测流程：



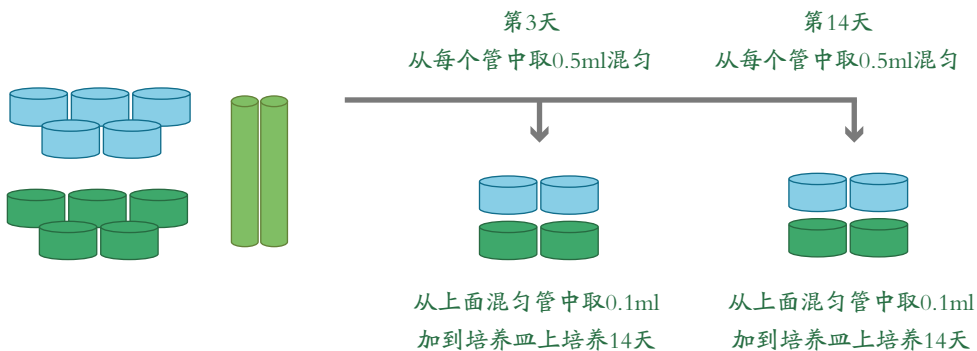
培养法检测过程

指示细胞培养法  
检测过程

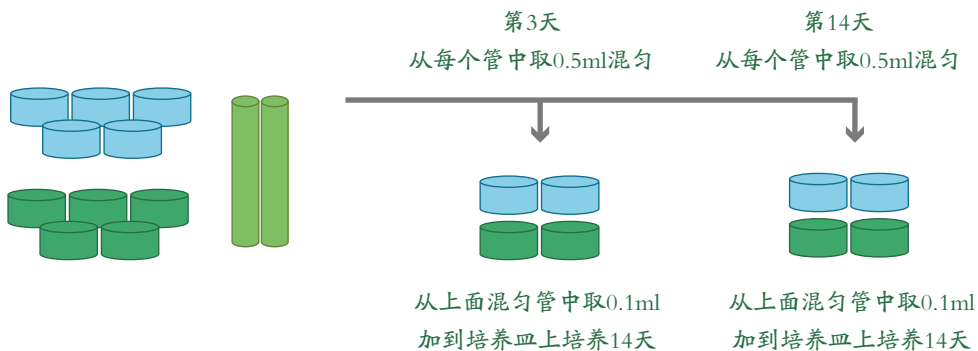


# △ 按照21 CFR 610.30中支原体检测的检测流程:


## 36°C/CO<sub>2</sub>培养




## 36°C/N<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub>培养



支原体肉汤  
固体培养基



精氨酸支原体  
固体培养基



支原体肉汤  
半流体培养基

## △ EP、USP和PTC在培养法检测中的区别：

### \* EP、USP和PTC方法在液体培养基条件下的差异

方法		EP	USP	FDA的考虑（1993）
液体培养	接种量	10ml接种到100ml； 第2-4天，6-8天， 13-15天，19-21天 分别转接	10ml接种到100ml； 第2-4天，6-8天， 13-15天，19-21天 分别转接	10ml接种到50ml； 第3天，第7天，第 14天分别转接
	阳性质控	每种支原体不高于 100CFU	每种支原体不高于 100CFU	每种支原体不高于 100CFU
	培养条件	35-38℃，需氧条件	36±1℃，需氧条件	36±1℃，需氧条件
	是否需要适用性验证	需要	需要	没有要求
	适用性验证的要求	与阳性对照相比，加入样本后菌株生长均需符合要求（每代传代均有效）	与阳性对照相比，加入样本后菌株生长均需符合要求（每代传代均有效）	/
	阳性对照的选择	根据样本类型选择	一个葡萄糖发酵的支原体，一个精氨酸水解的支原体，其他根据样本类型选择	一个葡萄糖发酵的支原体，一个精氨酸水解的支原体
	培养基灵敏度检查	必须使用所有适当的阳性对照菌株	必须使用所有适当的阳性对照菌株	未提及

## △ EP、USP和PTC在培养法检测中的区别：

\* EP、USP和PTC方法在固体培养基条件下的差异

方法		EP	USP	FDA的考虑（1993）
固体培养	接种量	每块平板上接种0.2ml	每块平板上接种0.2ml	0.2ml接种到2块或者更多的平板上
	阳性质控	每种支原体不高于100CFU	每种支原体不高于100CFU	每种支原体不高于100CFU
	培养条件	35-38℃，微需氧条件（包含5-10%CO <sub>2</sub> ）	36±1℃，微需氧条件（5-10%CO <sub>2</sub> ，O <sub>2</sub> 含量小于0.5%）	36±1℃，微需氧条件（5-10%CO <sub>2</sub> ，O <sub>2</sub> 含量小于0.5%）
	是否需要适用性验证	需要	需要	没有要求
	适用性验证的要求	加入样本的平板的菌落数比不加样本的平板的菌落数少于1/5，则不存在抑制物	加入样本的平板的菌落数比不加样本的平板的菌落数少于0.5log，则不存在抑制物	/
	阳性对照的选择	根据样本类型选择	一个葡萄糖发酵的支原体，一个精氨酸水解的支原体，其他根据样本类型选择	一个葡萄糖发酵的支原体，一个精氨酸水解的支原体
	培养基灵敏度检查	必须使用所有适当的阳性对照菌株	必须使用所有适当的阳性对照菌株	未提及

△ 21 CFR 610.30中支原体检测的关键点：

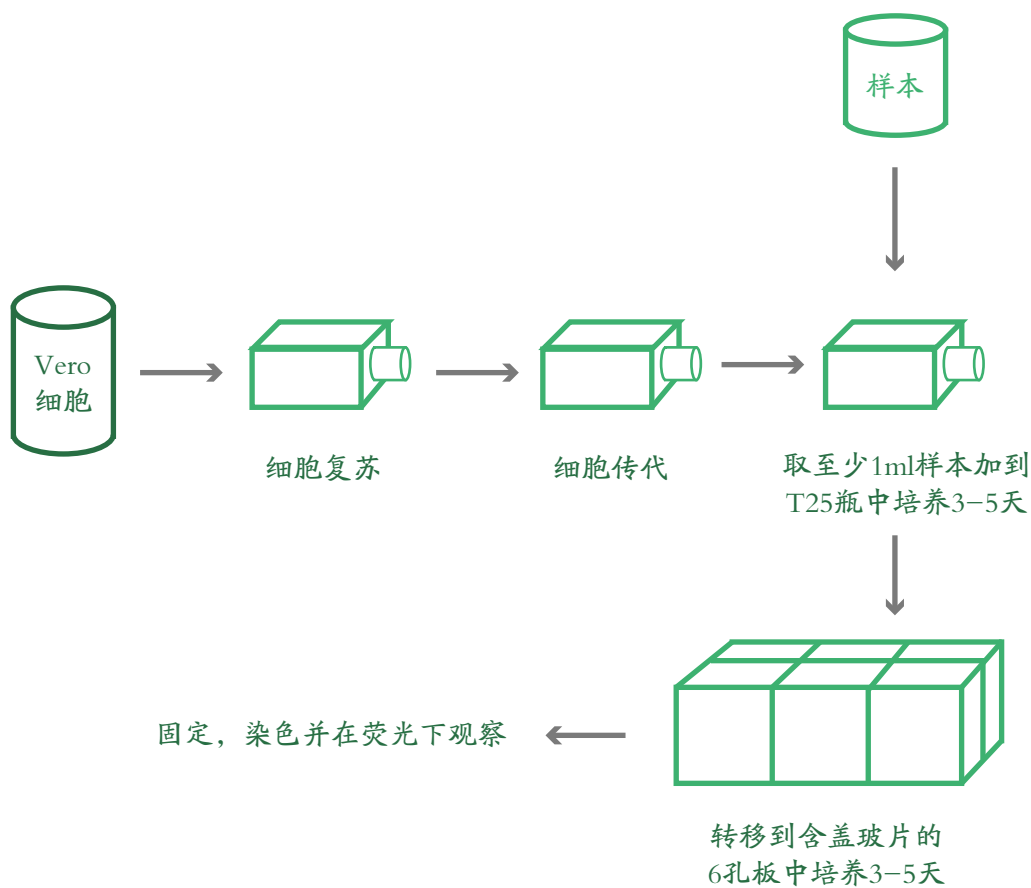
方法		21CFR 610.30
固体培养基 培养	接种量及 培养基类型	2ml样本、10个培养皿、 2种不同的培养基
	阳性质控	每种支原体不高于100CFU
	温度及培养条件	36 ± 1℃需氧和厌氧条件
	是否需要适用性验证	不需要
	适用性验证的要求	/
半流体 培养基培养	接种量	1ml转接到4个10ml 第3和14天传代
	阳性质控	每种支原体不高于100CFU
	温度及培养条件	36 ± 1℃需氧和厌氧条件
	是否需要适用性验证	不需要
	适用性验证的要求	/
细胞指示 培养法	支原体检测	没有说明

# 指示细胞培养法

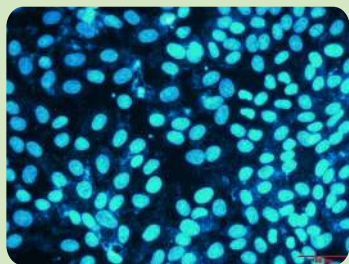
指示细胞培养法作为另一种支原体检测传统方法也被广泛应用。

药典	要求	相同点	不同点
中国药典	主细胞库、工作细胞库、病毒种子批、对照细胞以及临床治疗用细胞，病毒类疫苗的病毒收获液、原液用指示细胞培养法检测	实验过程相似，结果判断都是在荧光下观察是否出现典型的支原体荧光	指示细胞培养法必要时可以用于筛选培养基，阳性质控未说明滴度和种类及数量
欧洲药典	主细胞库、工作细胞库、病毒种子批或对照细胞，病毒收获液、批量疫苗或最终批次用指示细胞培养法检测		指示细胞培养法必要时可以用于筛选培养基，阳性质控为不大于100CFU的猪鼻支原体和口腔支原体
日本药典	主细胞库、工作细胞库以及生产过程中的细胞培养用指示细胞培养法检测		阳性质控为不大于100CFU的猪鼻支原体和口腔支原体
美国药典	用于生产测试品、消化液或任何其他疑似支原体污染的材料测试品、组织和细胞培养物用指示细胞培养法检测		阳性质控为不大于100CFU的猪鼻支原体和口腔支原体

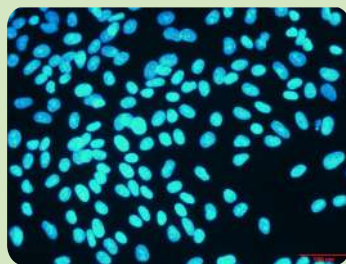
## △ 中国药典支原体指示细胞培养法检测流程



### 指示细胞培养法检测阴阳性结果示例



\*阳性质控 (Vero细胞+猪鼻支原体)



\*阴性质控 (Vero细胞)

## △ EP、USP和PTC在指示细胞培养法检测中的区别：

方法		EP	USP	FDA的考虑 (1993)
液体培养	接种密度	$2 \times 10^4 \text{cells} - 2 \times 10^5 \text{cells/ml}$ ( $4 \times 10^3 - 2.5 \times 10^4 \text{cells/cm}^2$ )	$2 \times 10^4 \text{cells} - 2 \times 10^5 \text{cells/ml}$ ( $4 \times 10^3 - 2.5 \times 10^4 \text{cells/cm}^2$ )	无明确
	接种量	1ml	1ml	1ml
	阳性质控	每种支原体不高于100CFU，包括口腔支原体和猪鼻支原体	每种支原体不高于100CFU，包括口腔支原体和猪鼻支原体	每种支原体小于100CFU包括口腔支原体和猪鼻支原体
	培养条件	35-38°C	$36 \pm 1^\circ\text{C}$	$36 \pm 1^\circ\text{C}$
	样本接种	培养3-5天接种到盖玻片上	培养3-5天接种到盖玻片上	直接接种到盖玻片上
	是否需要适用性验证	需要	需要	没有要求



# 核酸检测（NAT）法

培养法和指示细胞培养法均有其优缺点，因此在检测支原体时，建议2种方法结合，最终判断是否被支原体污染。而现在NAT方法的呼声越发高涨，EP、JP及USP皆支持：NAT经过合适的验证可以替代传统的培养法和指示细胞培养法。FDA、WHO都已经在相关指南中收录了NAT法检测支原体。替代不同的方法，其检测灵敏度有不同要求，如EP9.0 2.6.7中规定：作为培养法的替代方法，NAT测试系统必须检测到10CFU/mL；作为指示细胞培养法的替代方法，NAT测试系统必须检测到100CFU/mL。

支原体检测	时长	优缺点
培养法	28天	<ul style="list-style-type: none"><li>· 作为检测支原体的金标准，方法成熟；</li><li>· 检测灵敏度高；</li><li>· 检测时间长；</li><li>· 由于要加入阳性菌株作为质控，有一定被污染的可能性。</li></ul>
细胞指示培养法	21天左右	<ul style="list-style-type: none"><li>· 相比培养法时间短一些，但依旧很长，如一些细胞治疗产品等不起这么长时间；</li><li>· 检测灵敏度不高；</li><li>· 加入阳性质控时会有被污染的可能性。</li></ul>
NAT法	1天	<ul style="list-style-type: none"><li>· 时间短；</li><li>· 不加阳性菌株，减少会被污染的可能性；</li><li>· 检测灵敏度高；</li><li>· 由于支原体种类的多样和生物性的差别，需要对整个检测体系进行验证。</li></ul>

\* 不同支原体检测方法的比较



## △ 不同国家对NAT用于常规支原体检测的接受程度以及NAT验证的质量标准要求

	药品审批管理机构	出版药典	药典	支原体检测的NAT认可	NAT 验证要求的相关标准
欧洲	人用药品委员会 (CHMP)	质量管理局 (EDQM)	欧洲药典 (EP)	√	√
英国	由MHRA进行国家审批 由EMA进行集中审批	英国药典委员会	英国药典	√	√
美国	食品药品监督管理局 (FDA)	美国药典委员会	美国药典 (USP)	√	√
日本	药品与医疗器械管理署 (PMDA)	药品与医疗器械管理署 (PMDA)	日本药典 (JP)	√	√
中国	中国国家食品药品监督管理局 (NMPA)	中国药典委员会 (ChPC)	中国药典 (ChP)	不明确	不明确
巴西	国家卫生监督局 (ANVISA)	国家卫生监督局 (ANVISA)	巴西药典	无描述	×
阿根廷	药品管理局 (ANMAT)	药品管理局 (ANMAT)	阿根廷药典	无描述	×



# NAT方法的建立

## EP 10.0 : 2.6.21 核酸法扩增技术章节

在NAT法中，最常用的是核酸扩增法（PCR）。根据此章节要求，PCR法的建立需要进行系统的方法验证。其方法验证必须包括仪器和PCR方法的验证，具体可参考ICH指南Q2(R1)相关内容。

PCR检测的验证包括：阳性临界值的确定，定量分析的验证（准确度，精密度，特异性，定量限，线性，范围以及耐用性），试剂成分的质量控制，阈值线的分析以及运行程序的内外质控品的设置。

此章节还指出：由于PCR法的高灵敏度，样本必须不被目标序列所污染。样本存储、测试材料的转移必须在无目标片段污染的环境中。并且，为了避免污染，实验需要进行隔离分区。需要注意的有：人的流动、洁净服、物料流、气源以及无污染的操作流程。

IP17中也强调：由于核酸扩增方法可以检测到微量核酸，来自于设备、仪器、试剂等污染带来的扩增产物会导致假阳性。

为降低污染风险，尽可能对每个步骤分区进行，包括试剂储存和配制、核酸抽提、核酸扩增、扩增产物检测，并有特别的预防措施。实验人员要严格遵守相关的操作过程和实验室要求。

分隔区间为：①反应混合物；②PCR预处理；③PCR检测。

当结果判断时，只有确定阳性为阳性，阴性为阴性时，实验结果才是有效的。并且由于PCR方法的高度敏感性和高污染风险，有必要通过重复试验来确认阳性结果的可能性。在可能的情况下，对一个样本进行2次完整的检测。

## 方法学验证

“

可通过使用特异性引物扩增测试样本中提取的核酸来检测支原体。其中质控需要包括阴性对照和阳性对照。最好还添加内部质控，在整个实验过程前添加在样本中，以保证整个操作过程。如果样本出现抑制，需要消除样本的抑制。在定性实验中，其中阳性临界值的设定要求至少能够使95%的试验结果检测到最小目标序列数。

EP 10.0 : 2.6.21 章节



使用的方法必须根据上述描述经过验证，并需要考虑这章末所述的指导原则。最新版JP中有关支原体检测的要求类似于EP相关规定。

## △ EP 2.6.7 对验证要求详细总结

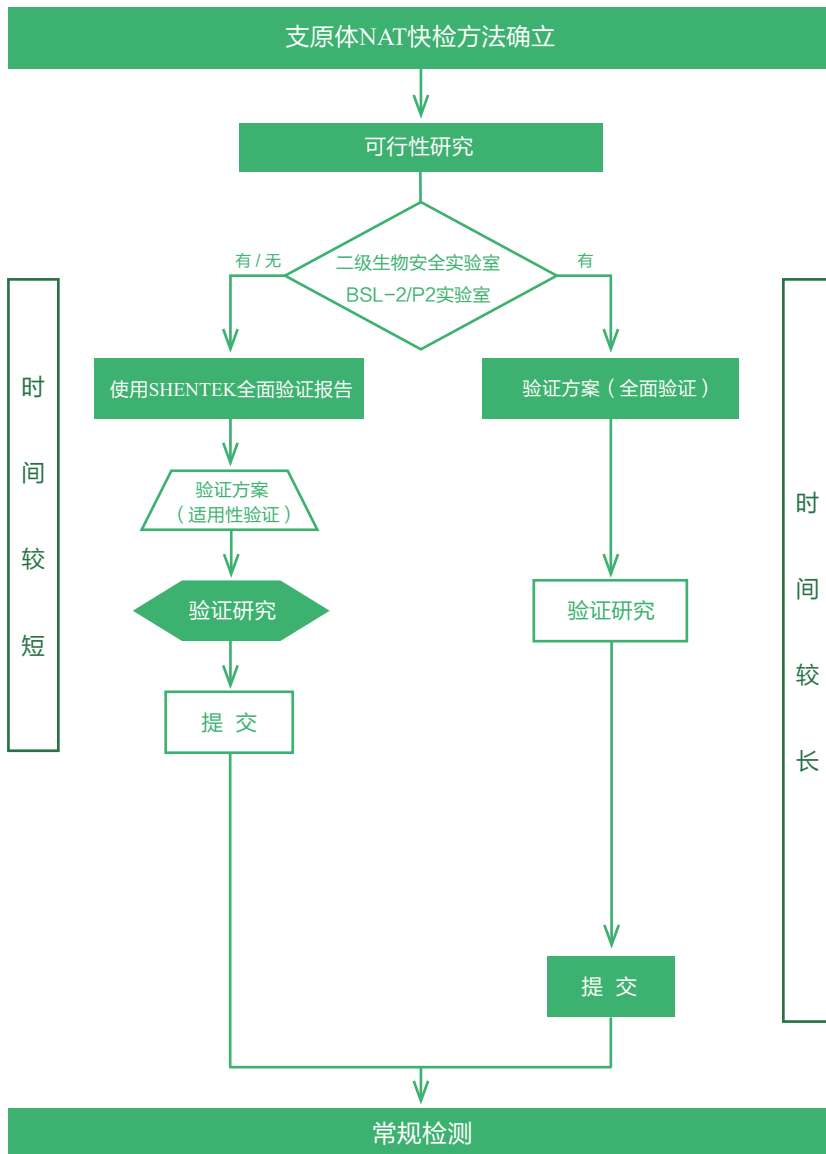
验证要求	EP10.0：2.6.7 章节总结
检测限	<p>检测限的界定要求必须针对每种支原体确定阳性检测临界值（EP 2.6.7. 章提供了用作检测的建议支原体种类）。</p> <p>每种支原体必须至少进行三次独立的10倍梯度稀释液进行检测，且每次检测中每种稀释液浓度都必须制备平行管进行检测，以使各稀释液浓度的检测结果总共能达到24个。</p> <p>阳性临界值指的是至少能够使95%的试验运行检测得到阳性结果的支原体浓度，即至少要取得23个有效的阳性检测结果。</p>
特异性	<p>NAT检测的挑战是要使用对多种支原体都具有适用性和特异性的PCR引物。往往覆盖的检测种类越多，PCR引物也越可能检测到其他种类的细菌。例如革兰氏阳性菌与支原体具有密切的系统进化相关性，PCR可能会检测到这种细菌属，从而产生交叉检测的情况（EP 2.6.7.章列举了一系列需要检测交叉反应性的细菌属）。</p>
稳定性	<p>需要证实NAT检测法是否能够在方法参数发生人为导致的微小变化，或检测方法有所变化时不受影响。EP2.6.7.章列举了一些变化示例和需要检测的试验方案。</p>
可比性	<p>可比性的评估应包含 NAT 检测法与药典检测法的 检测限对比。本章规定了以下测试标准：</p> <ol style="list-style-type: none"><li>1)以NAT法代替培养法：需要证实检测限至少达到 <math>\leq 10\text{CFU/ml}</math>。</li><li>2)用NAT法代替指示细胞培养法：对每种被测支原体的检测限都必须至少达到 <math>\leq 100\text{CFU/ml}</math>。</li><li>3)在这两种情况下，采用NAT法的检测和采用常规方法的检测必须同时进行，以使用相同样本（CFU可比性）对它们的检测限进行同步评估。</li></ol>



# MycoSHENTEK

## 【MycoSHENTEK qPCR（荧光探针法）支原体检测】

MycoSHENTEK支原体检测体系符合EP2.6.7中对于支原体验证的所有要求，可以替代培养法和指示细胞培养法。



\*MycoSHENTEK检测方案逐步验证和实施

## △ MycoSHENTEK支原体检测系统

1	SK0801MY50	支原体DNA提取纯化试剂盒（磁珠法）
2	SK0802MY50	支原体DNA检测试剂盒（PCR-荧光探针法）
3	SKRDP-32	rDNApurify HCD前处理系统



MycoSHENTEK支原体检测体系经过全面验证，经过国内三家联合实验室（中检院，四川省院，湖州营养中心）的验证（国内唯一），检测可靠，灵敏度高，达到10CFU/ml。

## △ 验证菌株结果

菌株	阳性数/总数		菌株	阳性数/总数	
	10cfu/ml	100cfu/ml		10cfu/ml	100cfu/ml
鸡滑液支原体	24/24	24/24	猪鼻支原体	24/24	24/24
精氨酸支原体	24/24	24/24	莱氏无胆甾支原体	24/24	24/24
鸡毒支原体	24/24	24/24	发酵支原体	24/24	24/24
柠檬螺支原体	24/24	24/24	人型支原体	24/24	24/24
口腔支原体	23/24	24/24	肺炎支原体	24/24	24/24

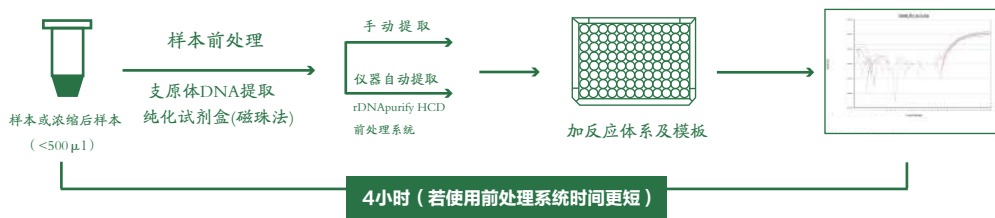
## △ MycoSHENTEK支原体检测试剂盒组成成分

测试系统	组分	保存条件
<b>支原体DNA提取</b>  MycoSHENTEK®支原体DNA提取纯化试剂盒 (磁珠法)  货号: SK0801MY50	裂解液 结合液 洗涤液A 洗脱液 稀释液	常温
	磁珠	2-8℃
	蛋白酶K	-18℃及以下
<b>支原体DNA检测</b>  MycoSHENTEK®支原体DNA检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)  货号: SK0802MY50	MyqPCR Reaction Buffer MyPrimer&Probe MIX 内部质控 (IC) 阳性质控 (PC) DNA稀释液	-18℃及以下

## △ 技术特点

简单快速	样本经前处理后直接进行qPCR检测，全程4小时
高灵敏度	经过多种支原体菌株验证，灵敏度可达10CFU/ml
符合法规	整个检测方法（包括前处理）经过验证，可提供验证报告，符合法规要求
设计可靠	含内部质控（IC）和阴阳性质控（PC、NCS、NTC），避免假阴性和假阳性
样本适用性广	可用于各种样本类型的检测（病毒，细胞，培养液，细胞制品等）
覆盖范围广	可检测120多种支原体
使用成本低	采用多重PCR，单个反应孔同时检测支原体信号和内控信号，减少试剂成本
质量保证	ISO13485体系认证，标准化生产，提供质检报告

## △ 支原体检测程序





## △ 反应液配制

10μl qPCR MIX	组份	MyqPCR Reaction Buffer	MyPrimer&Probe MIX	IC
	待测样本	8μl	1.5μl	0.5μl
	PC&NTC	8μl	1.5μl	/

+

20μl DNA

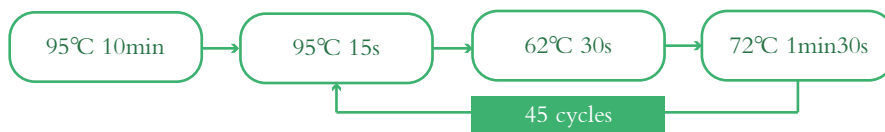
## △ 参数设置

支原体信号：报告荧光基团为FAM，猝灭荧光基团为none

IC信号：报告荧光基团为VIC，猝灭荧光基团为none

参比荧光：ROX（可选）

## △ 程序设置



## △ 结果判定

质控结果分析					
Ct-PC		Ct-NTC		Ct-NCS	
FAM	VIC	FAM	VIC	FAM	VIC
<40且有效的“S”型扩增	<40且有效的“S”型扩增	Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	<40且有效的“S”型扩增	Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	<40且有效的“S”型扩增

质控结果满足要求，方可分析样本结果！

质控判断标准可能因实验环境、设备、人员而有一定差异，可自行验证合适的质控标准。

待测样本检测结果分析		
FAM	VIC	结果判断
Ct<40且有效的“S”型扩增	<40且有效的“S”型扩增	阳性
	Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	有抑制
Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	<40且有效的“S”型扩增	阴性
	Ct≥40 或扩增曲线无明显起峰	有抑制

判断结果为有抑制，需要重测。若重测仍有抑制，考虑样本基质有干扰，针对FAM信号Ct值小于40的样本，可考虑对样本进行适当稀释；针对FAM信号≥40或者无扩增的样本，需考虑优化提取条件。

# 常见问题分析

## 一、关于前处理



### ? 1. 样本存在抑制现象，如何优化前处理？

提取前对样本进行处理（如稀释样本或离心取上清等）；提取时增加蛋白酶K用量或增加洗脱体积稀释样本；细胞类样本可适当降低细胞数或裂解细胞后再处理。



### ? 2. 前处理过程磁珠有结块现象，该如何解决？

可能是样本细胞数量过多所造成的，可以适当减少前处理细胞数量（小于 $10^6$ ），或者在提取中增加处理过程，如裂解细胞后快速离心去除细胞碎片，则可避免出现磁珠结块的现象。



### ? 3. 实际检测样品是否可以稀释，如何处理？

实际检测的样品不建议稀释，样品稀释可能导致支原体实际含量低于试剂盒检测限；一般可使用细胞悬液或上清直接检测，对于培养时间比较短的样品，也可以使用浓缩的方法进行样品处理，浓缩时可以使用高速离心浓缩等方法。



## 二、关于检测



### 1. 样本取样?

细胞制剂的样本类型可包含细胞上清和细胞悬液（细胞数量小于 $10^6$ /ml），病毒或疫苗类可以是需要被检的液体样本。



### 2. 阈值线该如何设置?

因实验条件（设备，人员，环境等）不同，应根据qPCR仪设定合理的阈值线。建议在进行支原体检测实验前，先测定24个阴性质控（NCS）和24个无模板对照（NTC）的Ct值，并在保证这两组数据未检出或Ct值不小于某一个固定值（该数值可根据实验室实际情况设定）的前提下设定阈值线。该固定值可作为阴阳性质控判断标准。



### 3. 检测结果复孔间阴、阳性结果不一致?

建议重测；重测仍不一致，如果VIC信号正常，建议采用培养方法复测。



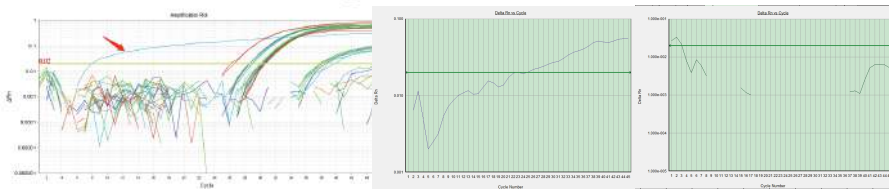
## 二、关于检测

— □ X

?

4. 样本或NCS有Ct值，且较小 (<10)，扩增曲线异常？

细胞制剂的样本类型可包含细胞上清和细胞悬液（细胞数量小于 $10^6/\text{ml}$ ），病毒或疫苗类可以是需要被检的液体样本。



?

5. 结果分析时出现VIC信号未检出，FAM信号较强？

首先确认IC加样准确，确保加入足量的IC，注意耗材是否是低吸附耗材；其次考虑FAM信号是否过强干扰VIC信号值，可通过稀释样本解决。



?

6. 样本或NCS有Ct值，且较小 (<10)，扩增曲线异常？

细胞制剂的样本类型可包含细胞上清和细胞悬液（细胞数量小于 $10^6/\text{ml}$ ），病毒或疫苗类可以是需要被检的液体样本。



### 三、关于方法学验证

— □ X

?

1. 方法灵敏度实验验证时应该先做10CFU/mL，还是做100CFU/mL菌株验证？

可先做10CFU/mL的菌株验证，再做100CFU/mL菌株验证；也可以同时进行；建议可先验证口腔支原体的灵敏度。



?

2. 样品适用性验证时是使用DNA稀释液还是使用样品基质（或待测样品）进行标准株的稀释？

应使用具体的样品基质（或待测样品）进行稀释，然后根据IC的检测值进行判断样品基质（或待测样品）是否有干扰；若IC检测值异常，则需要对样品进行适当处理。



?

3. 验证中涉及的支原体标准株10CFU和10CFU/mL有什么区别？

10CFU是指菌落数；10CFU/mL是指浓度单位，1mL体积里面含有10CFU菌落数。



?

4. 进行专属性验证实验检测时，发现Vero细胞DNA有信号？

可能是样本本身有污染或是实验过程中有交叉污染，环境中存在支原体污染或者最后加样时是否有污染等，需要排除。





## 资质

**湖**州申科生物技术有限公司拥有完善的支原体检测能力和相应的设施，包含有备案资质的P2实验室，细胞房，PCR实验室，厌氧培养系统等；实验人员具有实验室生物安全培训证书和PCR上岗证；细胞和支原体菌株来源正规，可溯源，可验证。

MycoSHENTEK支原体NAT检测体系（包括核酸提取前处理和qPCR检测）经过全面验证，并经过国内三家实验室的室间验证（国内唯一），检测可靠，灵敏度高，达到10CFU/ml。

湖州申科已为国内多家公司完成支原体核酸扩增检测法验证，替代培养法和指示细胞培养法进行支原体检测；并为多家企业提供和完成支原体检测（培养法、指示细胞培养法、qPCR法）并出具报告，用于申报注册等。



## 参考文献

1. Razin, S., Yogev, D., and Naot, Y. (1998) Molecular biology and pathogenicity of mycoplasmas. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 1094-1156.
2. Barile M.F., and Razin, S. (1993) Mycoplasmas in cell culture. In *Rapid Diagnosis of Mycoplasmas* (Kahane I., and Adoni, A., eds) pp. 155-193, Plenum Press, New York.
3. McGarrity G.J., Kotani H., and Butler, G. H. (1992) Mycoplasmas and tissue culture cells. In *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis* (Maniloff J., McElhaney R.N., Finch L.R., and J.B., B., eds) pp. 445-454, American Society for Microbiology, Washington, DC.
4. Windsor, H. (2010) IRPCM report: Prevention and Control of Mycoplasma Contamination in Cell Cultures. [http://www.the-iom.org/assets/files/IRPCM\\_Team\\_Mycoplasma\\_contamination.pdf](http://www.the-iom.org/assets/files/IRPCM_Team_Mycoplasma_contamination.pdf)
5. US Government (2010) Code of Federal Regulations. Title 21, Subpart D-Mycoplasma §610.30.
6. US Government (2010) Code of Federal Regulations, Title 21 §21 CFR.610.18(c): Cell lines used for manufacturing biological products.
7. United States Pharmacopeia (2010) <63> Mycoplasma Tests.
8. European Pharmacopoeia (2008) Chapter 2.6.7 Mycoplasmas. pp. 156-161.
9. FDA (2010) Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research. Guidance for Industry: “Characterization and Qualification of Cell Substrates and Other Biological Materials Used in the Production of Viral Vaccines for Infectious Disease Indications.” Rockville, MD: US Department of Health and Human Services.
10. FDA (1993) Food and Drug Administration. Center for Biologics Evaluation and Research. Points to consider in “Characterization of cell lines used to produce biologics.” Rockville, MD: US Department of Health and Human Services.