

沙门氏菌和志贺氏菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】沙门氏菌和志贺氏菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测粪便样本中沙门氏菌和志贺氏菌核酸。

沙门氏菌（*Salmonella*）是一类广泛分布于自然界，可使人 and 动物发病并具有极大危害的革兰氏阴性肠道致病菌。该细菌由 5 个亚属组成，血清型更为复杂，至今已发现 2200 多个，在我国已发现 200 多个，常见的有鼠伤寒沙门氏菌、猪霍乱沙门氏菌、肠炎沙门氏菌等，能引起人胃肠炎、伤寒、败血症等症状。志贺氏菌（*Shigella*）是一类具有高度传染性的革兰氏阴性肠道致病菌，通常称为痢疾杆菌。根据生化反应和 O 抗原结构的不同，志贺氏菌可以分为痢疾志贺氏菌、福氏志贺氏菌、鲍氏志贺氏菌和宋内氏志贺氏菌。在发展中国家，由福氏志贺氏菌引起的感染性腹泻疾病高居首位。实验室诊断方法目前主要有细菌培养、核酸检测等。

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设施及防护程序。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以沙门氏菌 *ssaR* 基因和志贺氏菌 *ipaH* 基因编码区的保守区为靶区域，设计引物和探针。通过分别以 Fam、Vic 和 Cy5 标记的沙门氏菌探针、志贺氏菌探针和内标对照探针，在同一反应体系中实现同时检测沙门氏菌和志贺氏菌。内标对照能够避免因样品中存在抑制物或操作失误所导致的假阴性结果。探针为包括 5' 端报告基团和 3' 端淬灭基团的寡核苷酸，在 PCR 扩增过程中，当探针完整时，由于淬灭基团靠近报告基团，报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收，不发出荧光信号。引物延伸时，与模板结合的探针被 Taq 酶（5'→3' 外切核酸酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离，产生荧光信号，荧光定量 PCR 仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，从而实现对病毒在核酸水平上的定性检测。

【主要组成成分】

组份名称	规格及数量	主要成分
核酸扩增反应液	250μL×1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液
酶混合液	10μL×1 管	Taq 酶、UNG 酶
沙门/志贺双重反应液	200μL×1 管	沙门氏菌、志贺氏菌和内标对照的特异性引物、探针
阳性对照	100μL×1 管	含灭活的肠炎沙门氏菌和痢疾志贺氏菌
去 RNA 酶水（空白对照）	1000μL×1 管	焦碳酸二乙酯
DNA 提取液	1500μL×2 管	TE 缓冲液（10mM 三羟甲基氨基甲烷，1mM 乙二胺四乙酸，pH 8.0）、含特定序列的 TOP 质粒

备注：不同批号间的试剂不能互换。

【储存条件及有效期】

-20℃ 避光保存，有效期 6 个月。

冰袋低温运输不能超过 4 天；开封后避光 -20℃ 贮存，对有效期没有影响；反复冻融次数不能超过 5 次。

生产日期及有效期至：见标签。

【适用仪器】

ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

本试剂盒适用于粪便样本增菌后的核酸检测。粪便样本采集按照《临床护理实践指南》（2012 版）中关于粪便样本采集法进行采集。自然排便采集，挑取有脓血或黏液部位的粪便 2~3g，采集的样本置于 3~5mL 增菌培养基（亚硫酸盐胱氨酸增菌液（SC 增菌液）或 Gram Negative Enrichment Broth（GN 增菌液））中 37℃ 增菌 4~6 小时。样本采集后及时保存，避免样本间交叉污染并密闭送检。样本采集后应及时检测，-20℃ 可以保存 12 个月。样本避免反复冻融，冻融次数不能超过 5 次，采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）：

从 -20℃ 取出试剂盒，将各试剂融化混匀并短暂离心后备用。取 N 个（N=待检测样本数+空白对照+阳性对照）PCR 反应管，每管按照反应液配制表加量要求依次加入核酸扩增反应液、酶混合液、沙门/志贺双重反应液。



反应液配制表（每人份）

反应液组份	加量（ μL ）/每人份
核酸扩增反应液	5
酶混合液	0.2
沙门/志贺双重反应液	4
去 RNA 酶水	10.8
总体积	20

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 样本DNA提取

2.1.1 样本需置于3~5mL增菌液（GN或SC）中37℃增菌4~6小时。

2.1.2 取1mL增菌液、加入于1.5mL无菌离心管中，10000rpm离心3min弃上清，保留沉淀。

2.1.3 向保留沉淀的离心管中，分别加入50 μL DNA提取液（含内标对照）同时阳性对照和空白对照各取50 μL ，亦分别加入50 μL DNA提取液（含内标对照），样本管、阳性对照管和空白对照管均振荡混匀、低速短暂离心后置于100℃煮沸5min。

2.1.4 10000rpm离心3min，取5 μL 上清液作为扩增模板。

2.2 加样

2.2.1 小心打开PCR反应管盖，在反应管中分别加入处理好的待测样本、空白对照、阳性对照各5 μL ，终体积为25 μL /管。

2.2.2 盖紧管盖，低速短暂离心。

3. PCR扩增检测（核酸扩增区）

3.1 将反应管放入荧光PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 循环参数设定（请参照各类仪器的操作说明进行设置）

步骤		温度	时间	循环数（次）
1	UNG酶处理	50℃	5 min	1
2	预变性	95℃	5 min	1
3	变性	95℃	10 s	40
	退火、延伸及检测荧光	55℃	40 s	
步骤3中55℃时荧光检测，检测通道选择为：Fam、Vic、Cy5				

*注：ABI 系列荧光PCR 仪不选 Rox 校正，淬灭基团选None。

3.3 结果分析

反应结束自动保存结果，根据分析后图像调节Baseline的Start值、End值以及Threshold值（可以根据实际情况自行调整，Start值可以在3~15、End值可设在5~20，调整空白对照的扩增曲线平直或低于阈值线），点击Analysis自动获得分析结果，在Report界面察看结果。

【阳性判断值】

根据临床试验结果，利用ROC曲线法最终确定本试剂盒的沙门氏菌参考值为CT值等于35.2；志贺氏菌参考值为CT值等于35.5。

【检验结果的解释】

质量控制

- 空白对照：无典型S型扩增曲线或CT值=Undet.，内标对照呈典型S型扩增曲线且CT值 ≤ 35 。
- 阳性对照：呈典型S型扩增曲线且CT值 ≤ 30 ，内标对照呈典型S型扩增曲线且CT值 ≤ 35 。
- 以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

结果判读

在仪器正常，空白对照、阳性对照均正常的情况下进行结果分析：Fam通道代表沙门氏菌，Vic通道代表志贺氏菌，Cy5为内标对照。

- 沙门氏菌阳性：扩增曲线呈典型S型曲线且CT ≤ 35.2 ，内标对照呈典型S型扩增曲线或CT值 ≤ 30 。
 沙门氏菌阴性：无典型S型扩增曲线或CT值=Undet.，内标对照呈典型S型扩增曲线或CT值 ≤ 30 。
- 志贺氏菌阳性：扩增曲线呈典型S型曲线且CT ≤ 35.5 ，内标对照呈典型S型扩增曲线或CT值 ≤ 30 。
 志贺氏菌阴性：无典型S型扩增曲线或CT值=Undet.，内标对照呈典型S型扩增曲线或CT值 ≤ 30 。
- 实验无效，需重新检测：样本无典型S型扩增曲线或CT值=Undet.，内标对照无典型S型扩增曲线或CT值=Undet.。

本检测结果仅供临床参考，不作为细菌感染诊治的唯一依据，阴性结果仅说明低于本试剂盒的检测阈值，但不能排除细菌感染的可能，阳性结果建议结合临床结果进一步确诊。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒用于体外定性检测人粪便样本中沙门氏菌和志贺氏菌核酸DNA，对于检测出的沙门氏菌和志贺氏菌结果不能用于区分亚型。2. 检测结果和样本采样、运输、保存条件及实验操作有关，其中任何失误都可能导致假阴性结果。如果样本在处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。

3. 本试剂盒检测结果阳性，表明样本中存在沙门氏菌或志贺氏菌核酸DNA，而非细菌本身，建议使用培养法进一步确诊。

【产品性能指标】

1. 灵敏度：沙门氏菌500cfu/反应，志贺氏菌500 cfu/反应；
2. 与感染部位相同或感染症状相似的其他病毒（A组轮状病毒、B组轮状病毒、C组轮状病毒、肠道腺病毒40型、诺如病毒GI、诺如病毒GII、札如病毒、星状病毒核酸、空肠弯曲菌、小肠结肠炎耶尔森菌、霍乱弧菌O1、霍乱弧菌O139、副溶血弧菌、致泻性大肠杆菌EIEC、EAEC、ETEC、EPEC、嗜水气单胞菌、单增李斯特菌）无交叉反应；与常见肠道非致病菌（双歧杆菌、乳酸杆菌、粪肠球菌、产气肠杆菌、阴沟肠杆菌、大肠杆菌和变形杆菌）无交叉反应。
3. 常用治疗腹泻的药物在样本中的浓度为诺氟沙星（120mg/mL）、左氧氟沙星（10 mg/mL）、甲磺酸左氧氟沙星（60mg/mL）、乳酸左氧氟沙星（4 mg/mL）、莫西沙星（20 mg/mL）、庆大霉素（8 mg/mL）、硫酸依替米星（40 mg/mL）、头孢类的头孢克肟（50 mg/mL）、头孢咪唑（200 mg/mL）、头孢曲松（200 mg/mL）和头孢丙烯（150 mg/mL）对试剂盒的检测没有干扰影响。
4. 同一批次的产品具有良好的批内重复性，变异系数CV均小于5%，三个不同批次的产品具有良好的批间重复性，相对偏差R均小于10%。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外检测试剂，操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
2. 实验需严格分区操作，各区物品、工作服、鞋等均应专用，实验后应立即清洁工作台。
3. 每次实验应设置空白对照和阳性对照，不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
4. -20℃保存的DNA样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
5. 本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。

【参考文献】

1. Tatavarthy A and Cannons A, Real-time PCR detection of Salmonella species using a novel target: the outer membrane porin F gene (ompF). Lett Appl Microbiol. 2010 Jun 1; 50 (6) :645-52. Epub 2010 Apr 5.
2. Nga TV, Karkey A, et al, The sensitivity of real-time PCR amplification targeting invasive Salmonella serovars in biological specimens. BMC Infect Dis. 2010 May 21; 10:125.
3. Yu XF, Pan JC, et al., Multiplex real-time PCR detecting Salmonella, Shigella and diarrheagenic Escherichia coli. Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. 2007 Nov; 41 (6) :461-5.
4. Vu Dinh Thiem, Orntipa Sethabutr, et al., Detection of Shigella by a PCR assay targeting the ipaH gene suggests increased prevalence of shigellosis in Nha Trang, Vietnam. J Clin Microbiol. 2004 May; 42 (5) :2031-5.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏硕世生物科技股份有限公司

住所：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村F幢（G14四楼办研区）

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】