

淋球菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）产品说明书

【产品名称】

通用名称：淋球菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测男女尿道拭子及女性宫颈拭子样本中淋球菌核酸（NG DNA）成分。

淋球菌（*Neisseria Gonorrhoeae*）是淋病的病原体，它属奈瑟菌属。人是淋球菌的唯一天然宿主，人对淋球菌感染没有免疫能力，所有人均有相同的易感性，因此再感染或慢性感染是较普遍的。淋病患者是传播淋病的主要传染源，淋病主要通过不洁性交而传染，性接触传播是淋病的主要传染形式。但也可以通过非性接触途径传播。非性接触传播通过污染的衣裤、床上用品、毛巾、浴盆、马桶等间接感染；新生儿淋菌性眼炎多通过淋病母体产道感染引起的。妊娠妇女患淋病，可以引起羊膜腔内感染及胎儿感染，此外还可以通过医务人员的手和器具引起医源性感染，轻症或无症状的淋病患者是重要的传染源。本试剂主要用于淋球菌临床辅助诊断。

【检验原理】

本试剂采用实时荧光探针 PCR 技术，扩增经处理后的样本（煮沸、抽提等方法获得的 DNA 模板）中淋球菌特异性基因片段，使用寡核苷酸荧光探针发射荧光信号，并依靠实时荧光定量 PCR 仪进行信号检测。于此同时，本试剂也会同步扩增检测人管家基因片段，并以此对样本提取、加样和扩增全过程进行质量控制。本试剂还具备尿嘧啶 DNA 糖基化酶（UDG）和 dUTP 系统，用于降解扩增污染物以降低假阳性率。

【主要组成成分】

名称	含量	单位	数量	主要成分
样本处理液	1.8	mL	×1	Tris-盐酸、乙二醇四乙酸二钠、曲拉通 X-100、十二烷基苯磺酸钠、NP40
NG-PCR 反应液	1	mL	×1	引物、探针、dNTP/dUTP、牛血清白蛋白、甜菜碱
酶液	15	μL	×1	Taq 酶、UDG 酶
阳性校准品	50	μL	×1	含有淋球菌核酸重组质粒
阴性校准品	50	μL	×1	人基因组 DNA

注：不同批次的试剂盒各组分不能混用。

【储存条件及有效期】

-20℃避光保存，12 个月内有效。

避免反复冻融，避免阳光直射暴晒。

生产日期，有效期至见产品包装盒。

【适用仪器】

本产品适用于 ABI7300、ABI7500、ABI7500 fast、Eppendorf Realplex 2、Eppendorf Realplex 4、Rotor-gene 3000、Bio-Rad CFX96 型实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本类型：男性尿道拭子和女性宫颈拭子。
2. 采样方法和采样注意事项：采集尿道拭子样本时，要求被检者在采样前 2 小时不能排尿。采取男性尿道拭子时，先用生理盐水清洁尿道口，将细小棉拭子伸入尿道 1-2cm，捻转 3-5 次获取样本。采取女性尿道样本时，将拭子伸入尿道 2-3cm 处，捻转 3-5 次，取出拭子。采取女性宫颈拭子样本时，先用生理盐水湿润扩阴器然后扩阴，使用无菌棉清理宫颈口过多的分泌物，使用新的拭子伸入宫颈，并使拭子头部完全进入，捻转 10-20 秒，取出拭子，避免接触阴道壁。将上述方法采集的拭子放入 1mL 无菌生理盐水中旋转洗涤片刻，在试管壁挤干后丢弃拭子。
3. 样本保存：所得的样本在 2-8℃保存不应超过 24 小时，在 -20℃保存不应超过 3 个月，并注意避免反复冻融。

【检验方法】

1. 核酸提取过程（在样本处理区进行）：
 - 1.1 将样本悬液置于 1.5mL 离心管中，盖上管盖，做好标记。
 - 1.2 将样本离心管置于离心机中，以 13000g 离心力离心 5 分钟，注意需要固定离心管方向，以便确定沉淀位置。
 - 1.3 吸弃上清，注意当沉淀不明显时应一次性在沉淀应出现位置对侧吸取，避免震荡和搅动沉淀。

- 1.4 加入 1mL 无菌生理盐水，盖上管盖，充分震荡混匀。
- 1.5 将样本离心管置于离心机中，以 13000g 离心力离心 5 分钟，注意需要固定离心管方向，以便确定沉淀位置。
- 1.6 吸弃上清，注意当沉淀不明显时应一次性在沉淀应出现位置对侧吸取，避免震荡和搅动沉淀。
- 1.7 加入 50μL 样本处理液，充分震荡混匀，短暂离心去除管壁上液滴后在 100℃ 水浴或干浴 10 分钟。
- 1.8 将样本离心管置于离心机中，以 13000g 离心力离心 5 分钟，取出离心管，管内上清液即为 PCR 反应模板，注意避免震荡和搅动。
2. PCR 试剂准备过程（在试剂准备区中进行）：
根据待测样本数和阴性校准品、阳性校准品数确定试剂使用数量 n，将试剂盒中 NG-PCR 反应液在室温融化，吸取 n×28μL 于一离心管中，再加入 n×0.4μL 酶液，混合均匀，短暂离心去除管壁上的液滴，然后以 28μL 每管分装到荧光 PCR 反应管中（剩余 n×0.4μL 不分装，以保证足量分液），做好标记。将准备好的 PCR 反应管转移至样本处理区。
3. 加样过程（在样本处理区进行）：
将【检验方法】1.8 步骤提取的 PCR 反应模板以及阴性校准品、阳性校准品按照每管 2μL 加入对应的 PCR 反应管底部，每加入一份样本需更换一个吸头。盖上管盖或者覆膜，记录加样顺序，将准备好的 PCR 反应管移至扩增检测区。
4. PCR 扩增检测过程（在扩增检测区进行）：
将【检验方法】3 步骤准备好的 PCR 反应管按照实时荧光定量 PCR 仪的要求放入仪器上样区进行扩增检测。
5. 反应程序：

根据如下表格中规定的反应温度、时间、循环步骤、循环数以及荧光检测步骤对实时荧光定量 PCR 仪的反应程序进行设定。

步骤	温度	时间	循环数
1 UDG 反应	50℃	2 分钟	1
2 预变性	95℃	10 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒钟
	熄火及荧光检测	58℃	35 秒钟
	延伸	72℃	20 秒钟
步骤 3 淋球菌荧光通道为 FAM，内参荧光通道为 HEX			

【阳性判断值】

1. 首先判断扩增曲线是否为正常的“S”型扩增曲线，然后根据各类仪器的软件进行分析，基线建议 6-9 循环起始，10-15 循环终止，或根据不同的仪器和样本测定具体情况决定，阈值线选在阴性校准品正常扩增曲线上方，得到各样本及校准品的检测结果 Ct 值。
 - ◆ 当 FAM 通道 Ct 值 ≤ 37 的样本为阳性。
 - ◆ 当 FAM 通道无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 的样本为阴性。
 - ◆ 当 FAM 通道 37 < Ct 值 < 40 的样本建议复测，如复测结果 FAM 通道 Ct 值 < 40 则为阳性，否则为阴性。
2. 每次测试时应同时测定试剂盒中阴性校准品和阳性校准品。仪器、试剂及操作正确的情况下阴性校准品应 FAM 通道无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40，HEX 通道 Ct 值 < 40；阳性校准品为正常“S”型扩增曲线且 FAM 通道 Ct 值 ≤ 37。无法同时达到上述两点说明测试无效，应检查试剂、操作、仪器和设置等方面的错误。
3. 目的检测结果 FAM 通道无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40，但 HEX 通道无 Ct 值或 Ct 值 ≥ 40 时，说明提取所得样本量过少或存在抑制检测反应的物质，应重新取样检测。

【检验结果的解释】

淋病奈瑟氏菌俗称淋球菌，为严格的人体寄生菌，常存在于急性尿道炎与阴道炎的脓性分泌物的白细胞中，形态染色类似于脑膜炎球菌。人类是淋球菌唯一的自然宿主，淋病主要由性接触而传播。淋球菌侵入泌尿生殖系统繁殖，男性发生尿道炎，女性引起尿道炎和宫颈炎。如治疗不彻底，可扩散至生殖系统。胎儿可经产道感染造成新生儿淋病性急性结膜炎。人类对淋球菌无自然免疫力，均易感，病后免疫力不强，不能防止再感染。因此，正常人体内不存在淋球菌及其核酸物质，本试剂盒对于正常人的检测结果应为阴性或低于最低检出限。

本试剂基于荧光 PCR 反应原理，对于阴性样本，其检测结果即是在最大循环数时无任何扩增，结果无 Ct 值或 Ct 为体系最大循环数。经试验证实，经过 40 次循环 PCR 扩增，足以将本试剂的可检测的最小浓度的靶序列扩增至可检测范围，增加循环数至 40 以上，对 40 个循环之前无扩增的样本仍然不会有扩增，因此，在第 40 个循环仍无扩增的样本判断为阴性样本。

【检验方法的局限性】

本试剂盒仅作定性检测，不能提供定量结果。

试剂盒仅针对待测样本进行测试，样本取样操作的差异可能会影响不同实验批次间结果的对比。

检测结果仅作为辅助诊断的参考，不能单独作为临床诊断的依据。

本试剂盒针对待测样本进行测试，并根据荧光 PCR 扩增结果的 Ct 值进行定性判读，所得的结果仅在其分析灵敏度范围内反映样本中是否存在淋球菌 DNA。

【产品性能指标】

分析灵敏度：每个反应可检出 1.0×10^2 copies 目的基因；

阴性符合率：检测企业阴性质控品，结果均为阴性；

阳性符合率：检测企业阳性质控品，结果均为阳性；

精密度：使用阳性校准品重复测试 10 次，使用检测结果 Ct 值计算变异系数（CV，%）， $CV \leq 5\%$ 。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断使用。
2. 应严格按照说明书要求的储存条件运输及储存试剂盒，避免反复冻融。
3. 试剂盒内各组分使用前应于室温完全融化、震荡混匀并短暂离心后再打开管盖使用，使用完毕后应及时拧紧管盖冷冻保存。
4. 应用本试剂盒进行检测应在专用检测室操作，检验室应划分不同的区域，至少包括试剂准备区，样本处理区及扩增检测区。各个区域间物流单向流动，人员按规定更衣，避免交叉污染。
5. 操作人员应熟悉 PCR 检测的操作规程，操作过程中应穿专用工作服，佩戴一次性手套，使用一次性用具，并经常更换。
6. 操作过程中用到的工作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常进行消毒处理。
7. 实验中废弃的吸头应弃置于含有 10%次氯酸等消毒剂的废液缸中，以防止污染。
8. 实验废弃物应视为传染性物质，应按照相关法规条例进行处理。

【参考文献】

C.A. Heid, J Stevens, K.J. Livak, P.M. Williams, Real time quantitative PCR, Genome Res. 1996, 6, 986-994

中华人民共和国卫生部. WS268-2007 淋病诊断标准[S]. 北京：人民卫生出版社，2008.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京康美天鸿生物科技有限公司

住所：北京市海淀区高里掌路 1 号院 16 号楼

联系方式：010-53275680

售后服务单位名称：北京康美天鸿生物科技有限公司

生产地址：北京市海淀区高里掌路 1 号院 10 号楼-1 层 101，北京市海淀区高里掌路 1 号院 16 号楼

生产许可证编号：京食药监械生产许 20080052 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163402579

【说明书核准日期】2016 年 12 月 29 日