

沙眼衣原体核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

说明书

【产品名称】沙眼衣原体核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于男性尿道拭子、女性宫颈拭子样本中沙眼衣原体核酸的定性检测。

沙眼衣原体（Chlamydia Trachomatis, CT）是引起非淋菌性尿道炎的主要病原体之一，典型症状为尿痛及尿道少许粘液性或粘液脓性分泌物。沙眼衣原体是一类在细胞内寄生的微生物，目前发现它分为 3 个生物型，有 15 个血清型，不同的血清型能引起不同的疾病。其中 A、B、Ba 及 C 型的衣原体株能引起沙眼，L1、L2、L3 型能引起性病性淋巴肉芽肿，D-K 型则引起非淋菌性尿道炎。另外，还可以引起化脓性宫颈炎、包涵体包膜炎、子宫内膜炎等。目前，沙眼衣原体的实验室诊断方法主要有细菌培养、免疫学检测、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防护设施及防护程序。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，选择沙眼衣原体的保守基因及人 β -globin 基因（内标）分别设计特异性引物和探针，探针为包括 5' 端报告基团和 3' 端淬灭基团的寡核苷酸，分别以 FAM、VIC 标记沙眼衣原体和 β -globin 的探针，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，从而实现沙眼衣原体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
沙眼衣原体反应液	900 μ L×1 管	氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液、引物、探针等
酶混合液	100 μ L×1 管	UDG 酶、Taq 酶
阳性对照	50 μ L×1 管	含沙眼衣原体、内标 β -globin 扩增片段的质粒
空白对照	250 μ L×1 管	经焦碳酸二乙酯处理的水

备注：不同批号间试剂盒组份不能互换；本试剂盒不包含但检测必需的配套提取试剂：硕世生物的核酸提取或纯化试剂（货号：SDK60103）或 QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen, NO. 51304）。

【储存条件及有效期】

避光-20±5℃贮存，有效期 12 个月。开封后避光-20±5℃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、有效期至：见试剂盒外包装。

【适用仪器】

ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

适用样本类型为男性尿道拭子、女性宫颈拭子。样本采集按照《临床标本采集指南》进行。

男性：采集样本前 2 小时禁止小便，用细小棉拭子伸入尿道约 2-4 厘米，捻动拭子采集分泌物（应略带黏膜）。将棉拭子置入无菌玻璃管，用无菌棉球将试管塞紧后，密闭送检。

女性：用无菌生理盐水棉球洗去宫颈外分泌物，再用无菌棉拭子插入宫颈内，停 5 秒钟后旋动棉拭子采取宫颈分泌物，将棉拭子置入无菌玻璃管中，用无菌棉球将试管塞紧，密闭送检。

样本采集后可立即用于检测，也可以 2℃-8℃ 保存 3 天，-20℃ 保存 6 个月，-70℃ 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。裂解样本在 -20℃ 可保存 1 个月。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

取出试剂盒，在室温下融化并振荡混匀后，低速离心 10 秒，计算需准备反应试剂人份数（n=样本数+2 管对照）。每人份反应体系配制如下：

反应液配制表（每人份）

反应液组份	加量（ μ L）/每人份
沙眼衣原体反应液	18
酶混合液	2
总体积	20

计算上述各试剂的使用量，加入一适当体积的离心管中，充分混匀后，按 20 μ L 的量分装到 n 个 PCR 反应管中。

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 核酸提取：

取 200 μ L 待测样本用硕世生物的核酸提取或纯化试剂（货号：SDK60103）或 QIAamp DNA Mini Kit（Qiagen, NO. 51304），按试剂盒说明书操作。注：内标 β -globin 为人内源性基因，非外源加入提取。

2.2 加样：

在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入处理好的待测样本核酸、空白对照、阳性对照各 5 μ L，终体积为 25 μ L/管，盖紧管盖，瞬时低速离心。

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（请参考各类仪器的操作说明进行设置）

步骤		温度	时间	循环数
1	UDG 酶处理	37℃	5 分钟	1 cycle
2	预变性	95℃	5 分钟	1 cycle
3	变性	95℃	10 秒	40 cycles
	退火、延伸及检测荧光	55℃	40 秒	
步骤 3 中 55℃时荧光检测，检测通道：FAM 、VIC				

*注：ABI 系列荧光 PCR 仪校正选 None，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】

利用受试者工作曲线（ROC）确定本试剂盒的沙眼衣原体临界 Ct 值为 35.3。

【检验结果的解释】

质量控制

通道	Ct 值	
	FAM 通道	VIC 通道
空白对照	Undet.	Ct > 37.0 或 Undet
阳性对照	Ct ≤ 30.0	Ct ≤ 30.0

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、阳性对照和阴性对照均正常的情况下，按照下表进行结果分析。

通道	病原体	阳性	阴性	可疑
FAM	沙眼衣原体	Ct≤35.3, 曲线呈 S 型且有明显指数增长期	Ct>37.6 或未检出	35.3< Ct≤37.6
VIC	内标β-globin	Ct≤35.0, 曲线呈 S 型且有明显指数增长期	Ct>35.0	

1. 结果可疑的样本要进行重复检测, 如重复检测实验结果 Ct 值仍然在 35.3-37.6 范围, 曲线呈标准 S 型且有明显指数增长期, 则判断为阳性, 否则判断为阴性。

2. 内标 β-globin 为阴性说明样本中含有 PCR 反应抑制物、提取失败或实验过程中漏加样本, 建议进行重新采样、重新提取或重新检测。当样本检测结果为阳性时, 若内标无扩增信号或者 Ct 值 > 35, 其阳性结果仍然可信。

3. 内标 β-globin 为人内源性基因, 当样本为分泌物培养液、纯菌液时, 内标 (VIC 通道) 不做要求。

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. 检测结果和样本采样、运输及保存条件有关, 其中任何失误都将会导致假阴性结果。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。

2. 本试剂盒检测结果阳性, 表明样本中存在沙眼衣原体核酸 DNA, 而非细菌本身, 建议使用培养法进一步确诊。

3. 检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【产品性能指标】

1. 企业参考品的符合率: 2份阳性参考品符合率100% (2/2), 4份阴性参考品的符合率100%(4/4)。

2. 最低检测限: 检测企业参考品不高于 5×10^2 IFU/mL。

3. 特异性: 沙眼衣原体与其感染部位相同、感染症状相似或种属近似且常见的其他病原体 (浓度为 1×10^6 copies/mL 的人乳头瘤病毒, 1×10^5 TCID₅₀/mL 的单纯疱疹病毒, 以及浓度为 1×10^6 CFU/mL 的淋球菌、解脲脲原体、沙门氏菌、志贺氏菌、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎支原体、肺炎衣原体、A 族链球菌、B 族链球菌、流感嗜血杆菌、嗜水气单胞菌、肺炎链球菌) 无交叉反应。

4. 精密性: 具有良好的重复性, 批内精密度的 CV 值小于 5%。

5. 干扰物质: 血液、脓液、诺氟沙星、左氧氟沙星、青霉素、大观霉素、四环素、红霉素、阿奇霉素、头孢曲松、硼酸水、雷夫诺尔、洁尔阴洗液、妇炎洁洗液、洗必泰在检验样本中的浓度分别为 25%、25%、400 mg/mL、200 mg/mL、500 mg/mL、400 mg/mL、300 mg/mL、300 mg/mL、400 mg/mL、500 mg/mL、3%、0.1%、10%、5%、0.05% 时, 对试剂盒的检测没有干扰影响。

6. 临床试验结果: 共检测 1040 例样本, 包括 520 例男性尿道拭子和 520 例女性宫颈拭子, 与对照方法相比, 阳性符合率 100%, 阴性符合率 99.73%, 总符合率 99.81%; Kappa 值为 0.9952, 说明两种方法检测性能具有很好一致性。

【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. 实验严格分区操作, 各区物品、工作服均为专用, 不得交叉使用, 避免污染, 实验后请立即清洁工作台。

3. 本产品使用前应在室温充分融化, 混匀并瞬时离心。

4. 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, 于有效期内使用试剂盒。

5. 冻存的 DNA 样本, 加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时离心后使用。

6. 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] Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR)-a Europe against cancer program. Leukemia. 2003;17 (12):2474-86.

[2] Claas HC, Wagenvoort JH, Niesters HG, et al. Diagnostic value of the polymerase chain reaction for Chlamydia detection as determined in a follow-up study. J Clin Microbiol., 1991, 29(1): 42-45.

[3] Mahony J.B., Luinstra K.E., Sellors J.W., et al. Comparison of Plasmid- and Chromosome-Based Polymerase Chain Reaction Assays for Detecting Chlamydia trachomatis Nucleic Acids. J. Clin. Microbiol., 1993, 31:1753-1758.

[4] Van Der Pol B, Ferrero DV, Buck-Barrington L., et al. Multicenter Evaluation of the BDProbeTec ET System for Detection of Chlamydia trachomatis and Neisseria gonorrhoeae in Urine Specimens, Female Endocervical Swabs, and Male Urethral Swabs. J. Clin. Microbiol., 2001, 39(3):1008-1016.

【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: 江苏省泰州市医药大道 837 号

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)、泰州市医药高新区药城大道 837 号

【医疗器械生产许可证编号】苏药监械生产许 20100121 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20183400058

【说明书核准日期及修改日期】2023.02.09