

奈瑟淋球菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：奈瑟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】

本试剂盒适用于体外定性检测女性宫颈拭子和男性尿道拭子样本中提取的奈瑟淋球菌(*Neisseria Gonorrhoeae*, NG)DNA，为奈瑟淋球菌感染的诊治提供辅助手段。

引发淋病的病原体是“奈瑟淋球菌”，即俗称的淋球菌。人类是淋球菌唯一的自然宿主，淋病主要由性接触而传播^[1]。淋球菌主要侵犯人类泌尿生殖道的柱状上皮，引起尿道炎和宫颈炎；也可由尿道或宫颈局部扩散感染，引起附睾炎、前列腺炎、子宫内膜炎、输卵管炎、盆腔炎等或经血行传播引起播散性淋病，女性患者如不及时诊断治疗，甚至可导致不孕。此外，淋球菌可引起泌尿生殖道以外的感染，如直肠炎、咽炎、新生儿眼结膜炎等^[2]。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光探针检测技术结合 PCR 扩增方法实现淋球菌核酸的检测，选取淋球菌保守序列作为荧光检测的靶基因，设计荧光检测的特异性的引物探针^[3,4]，探针的报告荧光基团为 FAM，淬灭荧光基团为 BHQ1，同时在 β -actin 基因上特异性保守区域设计特异性引物探针，报告荧光基团为 HEX，淬灭荧光基团为 TAMRA。扩增过程中通过 Taq 酶的 DNA 聚合酶活性和 5'-3'外切酶活性实现了 PCR 产物形成与荧光信号的累积的完全同步，从而对样本中的淋球菌实现定性检测，为性病患者的诊治提供辅助手段。

【主要组成成分】

编号	组成成分	规格	数量	组成说明
1	核酸反应液	900 μ L/支	1 支	含引物 (0.25 μ M)、荧光探针 (0.15 μ M)、PCR 反应液、热启动 DNA 聚合酶 (1.5U/反应)、尿嘧啶-DNA 糖基化酶 (0.3U/反应)、参比荧光 ROX
2	强阳性对照品	300 μ L/支	1 支	浓度为 10^7 Copies/mL 奈瑟淋球菌、 β -actin 内标人工合成质粒、丙三醇生理盐水溶液
3	弱阳性对照品	300 μ L/支	1 支	浓度为 10^4 Copies/mL 奈瑟淋球菌、 β -actin 内标人工合成质粒、丙三醇生理盐水溶液
4	空白对照品	300 μ L/支	1 支	丙三醇生理盐水

注：不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。

需自备试剂：DNA 提取试剂盒。推荐使用 QIAGEN 的 QIAamp DNA Mini Kit (51304)，或天根生化科技（北京）有限公司的病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒(DP315)。

需自备耗材：无菌生理盐水，采样用无菌棉签拭子，无菌试管，无 RNase 和 DNase Tip 头，一次性手套、无 RNase 和 DNase EP 管，荧光定量 PCR 八联反应管。

【储存条件及有效期】

本试剂盒于-18℃以下避光保存；试剂盒有效期 12 个月。

开封后，请于 3 个月内使用完，反复融冻次数不得多于 4 次，在-18℃以下的避光条件下运输，可稳定保存 5 天。

【适用仪器】

ABI7300/7500 荧光定量 PCR 仪、StepOne™/StepOnePlus™PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本采集

男性：取尿道分泌物用无菌细小棉签拭子伸入尿道约 2-4cm，略捻拭子取出分泌物(应略带黏膜)。将分

泌物或棉签拭子置入无菌离心管，用无菌棉球或橡皮塞将试管塞紧后，密闭送检。

女性：阴道—用无菌生理盐水棉球洗去宫颈外分泌物，再用无菌棉签拭子插入宫颈内，停 5 秒钟后略捻拭子采取宫颈分泌物(应略带黏膜)。将棉签拭子置入无菌离心管，用无菌棉球或橡皮塞将试管塞紧后，密闭送检；尿道—用无菌生理盐水棉球洗净尿道口，再用无菌棉签拭子插入尿道约 2cm，略捻拭子取出分泌物(应略带黏膜)。将棉签拭子置入无菌离心管，用无菌棉球或橡皮塞将试管塞紧后，密闭送检。

2. 存放

建议待测样本在 2~8℃ 保存不超过 24 小时；-18℃ 以下可长期保存，应避免反复冻融。

3. 运输

采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

[检验方法]

1. 样本处理（样本处理区）

向样本试管中加入 1mL 无菌生理盐水，充分震荡摇匀；建议采用 QIAGEN 的 QIAamp DNA Mini Kit (51304) 或天根生化科技（北京）有限公司的病毒基因组 DNA/RNA 提取试剂盒（DP315）进行核酸提取，严格按照试剂盒的说明书提取相应体积样本中 DNA。

建议提取得到的 DNA 的体积不少于 50μL；测定 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 在 1.4~2.0，浓度大于 1ng/μL，以保证 DNA 质量和数量满足实验需要；提取的 DNA 样本应立即用于检测或-18℃ 以下保存备用。

2. 扩增试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出核酸反应液，于冰上溶解后（20~30min），振荡混匀。根据所需准备样品数 n（n=样本数+1 管空白对照品+1 管强阳性对照品+1 管弱阳性对照品），向各荧光定量 PCR 八联反应管中加入 25μL 核酸反应液，压紧管盖，迅速将其转移至样本处理区，操作应在冰上进行。每次反应需要设置一个强阳性对照、弱阳性对照以及一个空白对照，剩余的核酸反应液和逆转录酶立即放入-18℃ 以下冻存。冻融后的核酸反应液在-18℃ 以下保存不超过 3 个月。

3. 加样（样本处理区）

在所设定各荧光定量 PCR 八联反应管中分别加入步骤 1 中提取的样本 DNA 及空白对照品、弱阳性对照品、强阳性对照品各 5μL，操作应在冰上进行，压紧管盖，2000rpm 离心 10sec。将荧光定量 PCR 八联反应管放入荧光定量 PCR 仪内，记录加样顺序。

4. PCR 扩增（检测区）

PCR 反应条件设置：

设置 PCR 仪的程序：

步骤	温度	时间	循环数
1	50℃	2min	1
2	95℃	5min	1
3	95℃	15second	40
	60℃	45 second (*)	

注：“*”为荧光收集步骤。

仪器检测通道选择：

- 1) 选择 FAM 通道(Reporter: FAM, Quencher: none)检测 NG-DNA；
- 2) 选择 HEX 或 VIC 通道（Reporter: HEX/VIC, Quencher: TAMRA）检测内标 DNA；
- 3) 参比荧光(Reference Dye)：选择 ROX。

具体检测通道设置可参照各仪器使用说明设置，Sample Volume 为 30。

5. 结果分析

阈值（threshold）设定原则以阈值线刚好超过正常空白对照曲线（无规则的噪音线）的最高点为准。

基线（baseline）的选择：如果待检样本中最小 Ct 值>18，基线的起始点（循环数）默认为 3 和 15，接收默认的分析结果，如果待检样本中最小 Ct 值<18，基线的终点改为[最小的 Ct 值-4]分析结果。

6. 质量控制

空白对照品: Ct 值为 0 或无数值;

弱阳性对照品: FAM 通道 Ct 值 $30 \leq Ct \leq 38$, HEX/VIC 通道 Ct 值 $30 \leq Ct \leq 35$;

强阳性对照品: FAM 通道 Ct 值 ≤ 26 , HEX/VIC 通道 Ct 值 ≤ 26 。

以上要求需在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 需重新进行。

[阳性判断值或者参考区间]

确定本试剂盒检测奈瑟淋球菌的阳性判断值为 Ct 值 ≤ 38 , $38 < Ct < 40$ 为灰度区; 检测内标的阳性判断值为 Ct 值 ≤ 35 , $35 < Ct < 40$ 为灰度区。奈瑟淋球菌参考值根据临床样本 Ct 值 ROC 曲线确定, 内标检测参考值根据临床样本 Ct 值单侧临界值法确定。

[检验结果的解释]

结果判断

1. 如果检测样本 Ct 值 ≤ 38 , 无论内标有无 Ct 值, 报告为奈瑟淋球菌 NG 检测阳性。
2. 如果检测样本内标 Ct 值 ≤ 35 , FAM 通道 Ct 值为 0 或无数值, 报告为奈瑟淋球菌 NG 检测阴性。
3. 如果检测样本内标 Ct 值 > 35 , FAM 通道 Ct 值为 0 或无数值或 $38 < Ct < 40$ 时, 需重新提取样本检测。
4. 如果检测样本内标 Ct 值 ≤ 35 , FAM 通道 Ct 值 $38 < Ct < 40$ 或存在轻微跳起的扩增曲线, 需重新检测。若重新检测的 FAM 通道 $38 < Ct < 40$, 则报告为 NG 检测阳性; 若重新检测的 Ct 值为 0 或无数值时, 报告为 NG 检测阴性。

检测为阴性, 并不代表该患者为非感染患者, 具体诊断结果须结合其他临床诊断结果判断。造成检测为阴性的可能是: ①不合理样本采集、转运及处理、样本中病原体滴度过低, ②病原体检测靶序列的变异, ③未经验证的其他干扰因素如: 服用抗菌药物等, ④患者为其他病原体或细菌引起的感染。

[检验方法的局限性]

1. 本试剂盒检测结果仅供临床参考, 对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中样本间的交叉污染, 很容易出现假阳性结果。因此, 临床实验室应严格按照《临床基因扩增检验实验室工作规范》配备设备及操作人员, 应严格按照说明书要求进行操作。

[产品性能指标]

1. 企业阳性质控品符合率: 检测企业阳性质控品 P1~P3, 奈瑟淋球菌须均为阳性, 且内标全部检出。
2. 企业阴性质控品符合率: 检测企业阴性质控品 N1~N5, 奈瑟淋球菌须均为阴性, 且内标全部检出。
3. 最低检测限: 检测企业最低检测限质控品 S, 重复 20 次, FAM 通道和 HEX/VIC 通道均分别至少 18 次检出。
4. 精密性: 检测企业精密性质控品 1 和企业精密性质控品 2, 各重复测定 10 孔, 检测奈瑟淋球菌的批内不精密度应满足 $CV \leq 5.0\%$ ($n=10$)。
5. 分析特异性

当样本中粘蛋白浓度不超过 60mg/mL, 加替沙星浓度不超过 8mg/L, 头孢克肟浓度不超过 7.6mg/L, 或罗红霉素浓度不超过 15.8mg/L 时, 对试剂盒检测无显著影响。

[注意事项]

1. 本试剂盒仅适用于体外检测。
2. 样品的采集、保存、运输、处理实验应遵循国家相应的管理规范和生物安全条例, 进行样本处理时必须做好相关的保护措施, 确保实验人员安全。
3. 实验区域请严格分区操作:
第一区: 试剂制备区-准备扩增所需试剂;
第二区: 样本处理区-待测样本和对照品处理;
第三区: 检测区-PCR 扩增检测。
4. 各区物品均为专用, 不得交叉使用, 避免污染; 实验后立即清洁工作台。
5. 试剂盒内各试剂使用前, 充分融化并振荡均匀后请短暂离心。
6. -18°C 以下保存的提取 DNA, 应在加样前置冰上解冻, 短暂离心。

7. 分装有核酸反应液的荧光定量 PCR 八联反应管应压紧管盖迅速转移至样本处理区。
8. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品黏附于管壁上，加样后应尽快压紧管盖。
9. 扩增完毕立即取出荧光定量 PCR 八联反应管，密封在高压灭菌袋内无害化处理。
10. 核酸反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各荧光定量 PCR 八联反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。
11. 实验中用过的 Tip 头请直接打入盛有 84 消毒液的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
12. 工作台及各种实验用品定期用 75%酒精或紫外灯进行消毒。
13. 实验中所用的离心管、Tip 头必须保证无 RNase 和 DNase。
14. 实验中所用过的离心管、Tip 头必须无害化处理。
15. 各区域内必备物品一览表（仅供参考）

试剂准备区	样本处理区	检测区
1. 离心机	1. 离心机	1. 荧光定量 PCR 仪
2. 混匀器	2. 混匀器	2. 紫外灯
3. 冰箱（4℃、-18℃以下）	3. 冰箱（4℃、-18℃以下）	3. 专用工作服、实验用品、一次性手套
4. 微量加样器一套	4. 微量加样器一套	
5. 离心管架	5. 离心管架	
6. 消耗品：一次性手套，带滤芯吸头、离心管	6. 消耗品：一次性手套，带滤芯吸头，离心管	
7. 紫外灯	7. 紫外灯	
8. 专用工作服和实验用品	8. 专用工作服和实验用品	

[参考文献]

1. 王惠榕, 严延生. 淋病奈瑟菌的分型方法及应用[J]. 中国艾滋病性病. 2012, 18(10): 715-719.
2. 彭朝阳, 吴新刚. 淋病奈瑟菌分型研究进展[J]. 微生物学免疫学进展. 2005, 33(2): 63-69.
3. 李金明. 实时荧光 PCR 技术. 人民军医出版社, 2007.
4. Shi G, Wen SY, Wang SQ, et al. Fabrication and optimization of the multiplex PCR-based oligonucleotide microarray for detection of *Neisseria gonorrhoeae*, *Chlamydia trachomatis* and *Ureaplasma urealyticum* [J]. Microbiological Methods, 2005, 62: 245– 256.

[基本信息]

注册人/生产企业名称：北京华大吉比爱生物技术有限公司

住所：北京市海淀区永丰屯 538 号 1 号楼 236、237 室

售后服务单位名称：北京华大吉比爱生物技术有限公司

联系方式：

电话：0086-10-80492001

传真：0086-10-80492118

邮编：101300

网址：[http:// www.gbi.com.cn](http://www.gbi.com.cn)

E-mail: gbi-office@genomics.cn

生产地址：北京市顺义区临空经济核心区裕华路 28 号 6 号 4 层，8 号 2 层西侧，12 号 3 层西，12 号 1 层西侧

生产许可证编号：京食药监械生产许 20060069 号

生产日期、生产批号及有效期至见产品包装盒

[医疗器械注册证编号/产品技术要求编号]

国械注准 20163401805

[说明书核准日期及修改日期]

核准日期：2016 年 12 月 05 日

修改日期：2017 年 11 月 09 日

