

淋球菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法） 说明书

【产品名称】

通用名称：淋球菌核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于男性尿道拭子、女性宫颈拭子样本中淋球菌核酸的定性检测。

淋球菌(*Neisseria Gonorrhoeae*, NG)是严格的人体寄生菌，常存在于急性尿道炎与阴道炎的脓性分泌物的白细胞中。淋球菌引起泌尿生殖系统化脓性感染，俗称淋病，是常见的性传播疾病之一。临床表现以尿道炎、宫颈炎多见，典型症状是排尿困难、尿频、尿急、尿痛、排出黏液或脓性分泌物等。亦可经产道感染胎儿造成新生儿淋病性急性结膜炎。目前，淋球菌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。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，选择淋球菌的保守基因及人 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 标记淋球菌和 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' $\rightarrow$ 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，从而实现淋球菌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
淋球菌反应液	900 μ L $\times$ 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 $\times$ 1 管	UDG 酶、Taq 酶
阳性对照	50 μ L $\times$ 1 管	含淋球菌、内标 β -globin 扩增片段的质粒
空白对照	250 μ L $\times$ 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℃贮存，有效期 10 个月。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、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中，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
淋球菌反应液	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（请参照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）确定本试剂盒的淋球菌临界 Ct 值为 35.5。

【检验结果的解释】

质量控制

对照	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 $\leq$ 30.0	Ct $\leq$ 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	淋球菌	Ct≤35.5, 曲线呈 S 型且有明显指数增长期	Ct>37.5 或未检出	35.5<Ct≤37.5
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 35.5-37.5 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, 表明样本中存在淋球菌核酸 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. 国家参考品的符合率: 10份阳性参考品符合率100% (10/10), 10份阴性参考品的符合率100%(10/10);

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: 检测国家参考品不高于 1×10^4 个/mL。

3. 特异性: 淋球菌与其感染部位相同、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, 1×10^6 IFU/mL 的沙眼衣原体, 以及浓度为 1×10^6 CFU/mL 的解脲脲原体、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. 精密度: 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 99.88%, 总符合率 99.90%; Kappa 值为 0.9971, 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] Maze MJ, Young S, Creighton J, et al. Nucleic Acid Amplification of the opa Gene for Detection of *Neisseria gonorrhoeae*: experience from a diagnostic laboratory. J Clin Microbiol. 2011;49(3):1128-9.

[3] Whitley DM, Anderson TP, Barratt K, et al. Evidence that the gonococcal porA pseudogene is present in a broad range of *Neisseria gonorrhoeae* strains; suitability as a diagnostic target. Pathology, 2006, 38(5):445-448.

【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)

【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20183400057

【说明书核准日期及修改日期】2023.02.09