沙眼衣原体核酸检测试剂盒（PCR– 荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：沙眼衣原体核酸检测试剂盒（PCR- 荧光探针法）

英文名称：CT DNA qPCR Detection Kit

【包装规格】

48 人份 / 盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测男性泌尿道、女性生殖道分泌物样本中的沙眼衣原体（Chlamydia trachomatis，CT）核酸（DNA）。

沙眼衣原体（CT）易引起眼结合膜及泌尿生殖系统黏膜感染，是常见的性传播疾病，是非淋菌性尿道炎的主要病原体，在世界范围广泛流行。在女性病人中，可导致异位妊娠和不育症等严重后果，在男性，主要引起非淋菌性尿道炎、附睾炎和直肠炎等。流行病学调查表明，在西方许多国家沙眼衣原体已成为导致性传播疾病 (STDs) 的主要病原体之一；在我国，泌尿生殖道感染中沙眼衣原体已成为 STDs 的重要病原体。本产品适用于沙眼衣原体感染的临床辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒基于荧光 PCR 方法的原理结合 Taqman 荧光探针技术，采用双色荧光 PCR 和 dUTP/UNG 防污染措施在全封闭的扩增体系中检测 CT 特异性基因片段，同时针对人的 β - 珠蛋白基因（HBB）保守区域设计特异性引物和探针作为内参对样本的采集、DNA 的提取及扩增进行监控。

【主要组成成份】

序号	试剂名称	主要成分	数量	规格
1	核酸提取液	螯合型树脂、乙二胺四乙酸	1	3 mL/ 管
2	扩增反应液	引物、探针、脱氧三磷酸核苷、DNA 聚合酶、尿嘧啶糖基化酶 (UNG 酶)	2	1.1mL/ 管
3	阳性对照	质粒 DNA	1	0.3mL/ 管
4	阴性对照	纯化水	1	0.5mL/ 管

注：1) 自备灭菌生理盐水（0.9% NaCL）；2) 不同批次试剂盒各组份不能混合使用。

【储存条件及有效期】

-20℃避光贮存，有效期 18 个月。

反复冻融次数不超过 10 次，请于有效期内使用。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本类型：男性泌尿道、女性生殖道分泌物样本

2. 样本的采集（要求病人在采样前 2 个小时不能排尿、采样前 24 小时禁止性生活，采样方法参照《性病实验室操作手册》）。

男性泌尿道：用棉拭子深入尿道 2-3cm，旋转 3-5 秒后取出。

女性生殖道：从宫颈取材，先用一棉拭子去除宫颈口粘液，再用另一棉拭子插入宫颈口 1.0cm-1.5cm，旋转并停留 10-30 秒，让棉拭充分吸附分泌物和脱落细胞。

采集后的棉拭子置入无菌收集管中，密闭送检。

3. 样本的保存和运输：

保存：待测样本在 2-8℃保存应不超过 24 小时；-20℃保存不超过三个月；-70℃以下可长期保存，应避免反复冻融。

运输：采用冰壶加冰或泡沫箱加冰袋密封运输。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

将扩增反应液室温解冻，充分融化后振荡混匀、瞬时低速离心数秒后，按待扩增样品数（待测样本数 + 阴、阳性对照各一份）分装至 PCR 反应管中，每管 45μL，盖上管盖后转移至样本处理区。避光放置于 4℃冰箱备用。

2. 样本处理（样本处理区）

DNA 提取：往样本收集管中加入 1mL 生理盐水，充分震荡洗涤棉拭子，然后将棉拭子靠管壁挤干丢弃，取 500μL 液体转移至 1.5mL 的管中，12000rpm 离心 5 分钟，弃上清，沉淀中加入 1mL 生理盐水，旋涡振荡器上振荡打散沉淀（必要时用枪头轻轻打散沉淀），12000rpm 离心 5 分钟，弃上清，沉淀中加入已振荡混匀的核酸提取液 50μL，旋涡振荡器上振荡打散沉淀（必要时用枪头轻轻打散沉淀），100℃干浴或者水浴 10 分钟，12000rpm 离心 5 分钟，上清液用于 PCR 反应（吸取时不要触动管子底部的沉淀物）。提取好的 DNA 应及时用于检测，否则应 -20℃保存，再次使用时，将提取好的 DNA 充分融化后 12000rpm 离心 5 分钟，取上清液用于 PCR 反应。

3. 加样（样本处理区）

加样：在准备好试剂的 PCR 反应管中分别加入阴性对照、待测样本 DNA、阳性对照各 5μL，盖紧管盖后，瞬时低速离心。

4. PCR 扩增（扩增区）

4.1 样品设置：根据样本类型设置样本编号、阴性对照和阳性对照。

4.2 荧光通道选择：每个样品选择 FAM 和 ROX 通道。参比荧光（Passive Reference）设置为 none。

4.3 反应条件设定

步骤		温度（℃）	时间（秒）	循环数（次）
1	UNG 酶反应	37	300	1
2	预变性	95	300	1
3	变 性	95	15	40
4	退火、延伸及检测荧光	60	50	
CT 检测通道：FAM； 内参检测通道：ROX				

反应体积设定为 50μL。

4.4 保存文件，运行程序。

5. 结果分析

ABI 7500 荧光 PCR 仪：将 Baseline 设为 3-15(根据实际情况，Baseline Cycler 可在一定范围内变化)，荧光阈值（Threshold）设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品扩增曲线（无规则的噪音线）的最高点，且 Ct 值显示为 Undet。使用仪器配套软件自动分析结果。

6. 质量控制

6.1 阴性对照：无明显 S 型扩增曲线，且 Ct 显示为 Undet。

6.2 阳性对照：2 个通道均有典型的 S 型阳性扩增曲线，且 Ct 值＜ 30。

6.3 上述两个条件必须同时满足，否则，本次试验无效。

【参考值范围】

1. Ct 值显示为 undet，阴性结果

2. Ct 值＜ 38，阳性结果

【检验结果解释】

在实验有效的前提下，阴、阳性判断如表 1、2。

表 1 各荧光通道 Ct 值和阴、阳性结果判断

荧光通道（靶基因）	Ct 值	各荧光通道阴、阳性判断结果
ROX（内参）	Ct 值 =40 （或显示为 undet）	阴性结果
	Ct<40， 且有明显 S 型扩增曲线	阳性结果
FAM（CT）	Ct 值 =40 （或显示为 undet）	阴性结果
	Ct<38， 且有明显的 S 型扩增曲线	阳性结果
	38 ≤ Ct 值 <40， 且有明显的 S 型扩增曲线	检测灰区，应重复测定一次，复测结果 Ct 值 <40，判断为阳性；复测结果 Ct 值 =40（或显示为 undet），判断为阴性结果;

表 2 CT 检测结果判定

内参	CT	结果判定
+	-	CT 阴性
+ 或 -	+	CT 阳性
-	-	PCR 反应失败，可能是 DNA 样品制备过程中有抑制物，建议将 DNA 稀释 10 或者 100 倍后重复测定，如果有荧光信号，则按上述判定结果，否则重新进行采样。

注：“+”表示阳性；“-”表示阴性

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒适用于辅助临床诊断，对患者的临床诊治应结合其它实验室检查综合考虑。

2. 样本在收集、处理、运输以及保存不当时，可能出现假阴性或假阳性结果。

3. 有关假阴性结果的可能性分析

不合理的样本采集、转运及处理、样本浓度过低均有可能导致假阴性结果。

待测靶序列的变异或其它原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。

同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒能检测出相当于 10copies/μL 的 CT DNA。

2. 采用企业阴、阳性参考品对试剂盒进行检测，符合率为 100%。

3. 精密度: 本试剂盒的批内和批间的精密度 Ct 值的变异系数均小于 5%。

4. 特异性：本试剂盒经实验证明不会与临床常见其它各类病原体产生交叉反应，同时，内源性干扰因子粘蛋白对检测无影响。具体见下表：

交叉反应性 （与以下样品未见交叉反应）		内源性干扰物质 （不受以下浓度物质的干扰）
白色念珠菌	黏质沙雷氏菌	粘蛋白 (200mg/dL)
粪肠球菌	肠炎沙门氏菌	
产芽孢梭菌	绿脓假单胞菌	
短小芽孢杆菌	金黄色葡萄球菌	
大肠埃希氏菌	藤黄微球菌	
乙型溶血性链球菌	单纯疱疹病毒	
人乳头瘤病毒		

5. 临床研究显示：通过 630 例临床标本研究，本试剂盒检测结果和临床参比试剂检测结果经过 Kappa 统计，Kappa 值大于 0.9，其一致性强，本试剂盒具有较好的临床实用性。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外诊断试剂，仅供体外诊断使用。实验员在实际操作之前应进行操作程序和试验结果分析的培训，熟练掌握后方可进行试验。

2. 整个实验过程应分三个区域进行（试剂准备区、样本处理区、PCR 扩增区），请严格分区操作；各区专用的仪器、设备、耗材和工作服均为专用，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，混匀并瞬时低速离心。

4. 每次实验应设置阴、阳性对照品。不同批号的试剂请勿混用，并在有效期内使用试剂盒。

5. 实验样品尽可能新鲜，提取过程应严防 DNA 酶污染及操作不当导致的 DNA 降解。

6. 在 -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。

7. 所有液体的混匀都要在振荡器上进行，不能用移液器吹打。

8. 反应液分装时尽量避免产生气泡，放入扩增仪前应检查各 PCR 反应管是否盖紧，避免对仪器及环境的污染。

9. 本试剂盒涉及的检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] 李金明 . 实时荧光 PCR 技术 [M]. 北京：人民军医出版社，2007.

[2] Boel, C. H. E, C. M. C. van Herk, P. J. M. Berretty, G. H. W. Onland, and A. J. C. van den Brule. Evaluation of
conventional and real-time PCR assays using two targets for confirmation of the COBAS AMPLICOR CT/NG test for
Neisseria gonorrhoeae in clinical samples[J]. Clin. Microbiol, 2005, 43:2231-2235.

[3]S N Tabrizi,S Chen,M A Cohenford,et al. Evaluation of real time polymerase chain reaction assays for confirmation of Neisseria gonorrhoeae in clinical samples tested positive in the Roche Cobas Amplicor assay[J].Sex Transm Infect, 2004, 80(1): 68-71.

[4] David M, Whiley, Theo P,Sloots. Comparison of three in-house multiplex PCR assays for the detection of Neisseria gonorrhoeae and Chlamydia trachomatis using real-time and conventional detection methodologies [J]. Pathology, 2005, 37(5), pp. 364–370.

[5] Jingfeng Tang, Li Zhou, Xiaoying Liu,et al. Novel multiplex real-time PCR system using the SNP technology for the simultaneous diagnosis of Chlamydia trachomatis, Ureaplasma parvum and Ureaplasma urealyticum and genetic typing of serovars of C. trachomatis and U. parvum in NGU[J]. Molecular and Cellular Probes, 2011, 55-59.

【生产企业】

企业名称：上海普洛麦格生物产品有限公司
注册地址：上海市闵行区新骏环路 88 号 12 幢 B 栋
生产地址：上海市闵行区新骏环路 88 号 12 幢 102 室和 202 室
上海市闵行区新骏环路 188 号 8 幢 303 室 B 区和 C 区
邮政编码：201114
电话：021-67766342
传真：021-34798118
网址：http://www.shpromega.cn

【医疗器械生产企业许可证编号】：沪食药监械生产许 20142047 号
【医疗器械注册证书编号】： 国械注准 20143401931
【产品标准编号】：YZB / 国 6456-2014
【说明书批准日期及修改日期】：2016 年 5 月 12 日