

沙眼衣原体/解脲脲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/解脲脲原体核酸检测试剂盒（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的提取的沙眼衣原体（*Chlamydia trachomatis*, CT）、解脲脲原体（*Ureaplasma urealyticum*, UU）DNA，为沙眼衣原体、解脲脲原体感染患者的诊治提供辅助手段。

沙眼衣原体是一种“绝对寄生病原体”，属革兰氏阴性微生物，可导致沙眼，还会引致人类泌尿生殖系统的感染^[1]，严重可导致不孕症^[2]。孕妇感染后可致流产，传染新生儿可能引起结膜炎和肺炎。解脲脲原体为脲原体属中唯一的一个种。解脲脲原体可引起泌尿生殖道感染，并被认为是非淋球菌性尿道炎中仅次于衣原体的重要病原体。解脲脲原体可以通过性传播，以及孕妇的血液、生殖道传播给胎儿，能够引起不育、早产，以及某些新生儿疾病^[2,3]。解脲脲原体感染是引起男女不育症的重要因素之一。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光探针检测技术结合 PCR 扩增方法实现沙眼衣原体、解脲脲原体核酸的检测。选择沙眼衣原体和解脲脲原体的保守区域作为检测靶基因，设计荧光检测的特异性引物探针，其中沙眼衣原体特异性探针 5'标记为 FAM 荧光基团，3'BHQ1 淬灭基团；解脲脲原体特异性探针 5'标记为 VIC 荧光基团，3'TAMRA 淬灭基团。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完全同步，从而对样本中的沙眼衣原体、解脲脲原体的定性检测，为性病患者的诊治提供辅助手段^[2,3,4]。检测体系中增加内标，选取 β -actin 基因作为内标^[5]，设计特异性的引物探针，标记为 ROX 荧光基团；通过内标扩增是否正常来监测待测样本的处理过程以及检测中是否存在 PCR 抑制反应，避免检测的假阴性。

【主要组成成分】

编号	组成成分 (32 人份/盒)	规格	数量	组成说明
1	核酸反应液	900 μ L/支	1 支	含检测的特异性的引物 (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) 配制而成。
2	强阳性对照品	300 μ L/支	1 支	浓度为 10 ⁷ Copies/mL 沙眼衣原体、解脲脲原体、 β -actin 基因人工合成质粒
3	弱阳性对照品	300 μ L/支	1 支	浓度为 10 ⁴ Copies/mL 沙眼衣原体、解脲脲原体、 β -actin 基因人工合成质粒。
4	空白对照品	300 μ L/支	1 支	丙三醇生理盐水溶液

注：不同批号试剂盒中各组分不得互换。

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)。

需自备试验材料：无菌生理盐水，采样用无菌棉签拭子，无菌试管，1.5mL 无 RNase 和 DNase 的离心管，无 RNase 和 DNase Tip 枪头，无水乙醇，移液器，涡旋振荡器、离心机。

【储存条件及有效期】

本试剂盒应储存于-18℃以下避光条件下；试剂盒有效期 12 个月。

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

生产日期、生产批号及有效期至见产品包装盒。

【适用仪器】

ABI7300/7500 荧光定量 PCR 仪、StepOne™ Plus 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管，用无菌棉球或橡皮塞将试管塞紧后，密闭送检。

2. 存放

待测样本在 2~8℃保存不应超过 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）（对照品无需提取）

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 OD_{260nm}/OD_{280nm} 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，振荡混匀。根据需要准备样品数 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。用毕的核酸反应液立即放入-18℃以下冻存，建议反复融次数不多于 4 次，存放时间不超过 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）

4.1 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。

4.2 仪器检测通道选择：

- 1) 选择 FAM 通道 (Reporter: FAM, Quencher: none) 检测 CT-DNA;
- 2) 选择 HEX/VIC 通道 (Reporter: HEX/VIC, Quencher: TAMRA) 检测 UU-DNA;
- 3) 选择 ROX 通道 (Reporter: ROX, Quencher: none) 检测内标-DNA。
- 4) 设置 Sample Volume 为 30。具体检测通道设置可参照各仪器使用说明。

5. 结果分析

阈值 (threshold) 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照曲线 (无规则的噪音线) 的最高点为准, FAM 探针扩增曲线、HEX/VIC 探针扩增曲线和 ROX 探针扩增曲线的阈值应分别设定。

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

	FAM(CT)	HEX/VIC(UU)	ROX(内标)
强阳性对照品	Ct 值 ≤ 26	Ct 值 ≤ 26	Ct 值 ≤ 26
弱阳性对照品	30 ≤ Ct 值 ≤ 38	30 ≤ Ct 值 ≤ 38	30 ≤ Ct 值 ≤ 35
空白对照品	0 或无数值	0 或无数值	0 或无数值

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。

[阳性判断值或参考区间]

确定本试剂盒的沙眼衣原体阳性判断值为 FAM 检测通道 Ct 值 ≤ 38, 阴性样本参考值为 FAM 检测通道 Ct 值为 0 或无数值, FAM 通道检测 38 < Ct < 40 为灰度区。

确定本试剂盒的解脲脲原体阳性判断值为 HEX/VIC 检测通道 Ct 值 ≤ 38, 阴性样本参考值为 HEX/VIC 检测通道 Ct 值为 0 或无数值; HEX/VIC 通道检测 38 < Ct < 40 为灰度区。

以上参考范围根据临床样本 Ct 值制作 ROC 曲线确定。

检测内标的阳性判断值为 Ct 值 ≤ 35, 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]

FAM(CT)	HEX/VIC(UU)	ROX(内标)	结果分析
-	-	Ct ≤ 35	报告为沙眼衣原体和脲原体检测阴性
Ct ≤ 38	-	Ct ≤ 35	报告为沙眼衣原体检测阳性
-	Ct ≤ 38	Ct ≤ 35	报告为脲原体检测阳性
Ct ≤ 38	Ct ≤ 38		报告为沙眼衣原体和脲原体检测阳性

注: “-”表示无 S 型扩增曲线, 且检测的 Ct 值为 0 或无数值; 空白表示可不参考。

若核酸反应液检测待检样本 FAM 或 HEX/VIC 通道有明显 S 型扩增曲线且 Ct 值 > 38 时或样本有轻微跳起及有曲线存在时, 需复检, 复检的结果仍如此, 则报相应病原体为阳性; 复检核酸反应液检测待检样本的 FAM 或 HEX/VIC 通道 Ct 值为 0 或无数值, ROX 通道的内标检测待检样本有明显 S 型扩增曲线且 Ct 值 ≤ 35, 报告为阴性。

若核酸反应液检测待检样本 FAM 或 HEX/VIC 通道 Ct 值为 0 或者无数值, 内参检测 ROX 通道的内标检测待检样本 Ct 值 > 35 或无数值, 则该样本检测结果无效, 应查找并排除原因, 并对此样本进行重复实验。

核酸反应液检测的 ROX 通道的内标检测 Ct 值 > 35 时, 可能有以下原因:

- a) 未采集到足够的细胞样本，建议重新采样检测。
- b) 核酸提取过程异常，导致 DNA 损失，建议重新提取 DNA 检测。
- c) 样本中存在抑制物质，可对样本进行稀释后检测。

[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. 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：服用抗菌或病毒药物等，④患者为其他病毒或细菌引起的感染。

[产品性能指标]

1. 阴性参考品符合率

用本试剂盒检测人脲原体核酸检测国家阴性参考品 N1-N8，检测结果均为解脲脲原体阴性；检测经标化的企业阴性质控品 N1-N5，沙眼衣原体和解脲脲原体均为阴性，内标检测为阳性。

2. 阳性参考品符合率

用本试剂盒检测人脲原体核酸检测国家阳性参考品 P1-P14，检测结果应均为解脲脲原体阳性；检测经标化的企业阳性质控品 P1-P8，要求 P1、P2、P5、P6 的沙眼衣原体和解脲脲原体须均检测为阳性，P3、P7 检测为沙眼衣原体为阳性，P4、P8 检测为解脲脲原体阳性，内标检测均为阳性。

3. 最低检测限

用本试剂盒检测人脲原体核酸检测国家检测限参考品 L1-L4，结果均为解脲脲原体阳性；检测企业最低检测限质控品 S，重复 20 次，至少 18 次的沙眼衣原体、解脲脲原体、内标检测为阳性。

4. 重复性

用本试剂盒检测人脲原体核酸检测国家重复性参考品 R1-R2，结果应均为解脲脲原体阳性，计算批内精密性 CV 不大于 5.0%；检测经标化的企业精密性质控品 1 和 2 各 10 次，沙眼衣原体、解脲脲原体、内标应均为阳性，且 Ct 值的变异系数（CV）不大于 5.0%。

5. 分析特异性

本试剂盒与奈瑟淋球菌、白念珠菌、人乳头瘤病毒、阴道毛滴虫病原体、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 I 型（HSV-1）、单纯疱疹病毒 II 型（HSV-2）、人型支原体、生殖支原体、金黄色葡萄球菌 L 型以及人基因组均无交叉。

样本中存在粘蛋白浓度不高于 60mg/mL、阿奇霉素不高于 20mg/L、盐酸多西环素不高于 25mg/L、盐酸左氧氟沙星不高于 8mg/L 时，对沙眼衣原体和解脲脲原体的检测无显著影响。

[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℃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。

【参考文献】

- 1) Gang Shi, Si-Yuan Wen, Su-Hong Chen, 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.
- 2) Hong-bo Wei, She-xiao Zou, Xiao-lin Yang, et al. Development of multiplex real-time quantitative PCR for simultaneous detection of Chlamydia trachomatis and *Ureaplasma parvum*[J]. Clinical Biochemistry, 2012, 07961: 1-5.
- 3) Jongyoun Yi, Bo Hyun Yoon, Eui-Chong Kim. Detection and biovar discrimination of *Ureaplasma urealyticum* by real-time PCR[J]. Molecular and Cellular Probes, 2005, 9: 255–260.
- 4) 李金明. 实时荧光 PCR 技术. 人民军医出版社, 2007.
- 5) Haijing Li, Stephen Dummer, Wray R. Estes, et al. Measurement of Human Cytomegalovirus Loads by Quantitative Real-Time PCR for Monitoring Clinical Intervention in Transplant Recipients[J]. Journal Of Clinical Microbiology, 2003, 41(1): 187-191.

【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: gbj-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

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20163401806

【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

修改日期: 2021 年 08 月 26 日