

结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书

[产品名称] 结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

[包装规格] 32 人份/盒

[预期用途]

试剂盒用于体外定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌核酸。

结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, MTB)是重要的全球性致病菌,由其引起的结核病是世界上致死率最高的传染病之一。据世界卫生组织报告,每年约有 200 万人死于结核病,其中 98%的死亡都发生在发展中国家^[1,2]。结核分枝杆菌感染患者,一般 X 线检查较易发现肺内异常阴影,同时伴有长期咳嗽、咳痰或不明原因低热。非结核分枝杆菌(Non-*Mycobacterium tuberculosis*, NTB)常导致与结核病类似的症状,常规的临床诊断技术如 X 光透视、痰菌涂片等很难区分,且存在特异性差和阳性率低的问题,而分离培养通常需要较长的时间^[3]。因此,结核分枝杆菌的快速诊断是治疗结核病的关键,建立简便、特异、快速的病原学诊断方法,在结核病临床诊断中具有重要意义。本试剂盒为结核分枝杆菌疑似感染患者的诊断提供辅助手段。检测结果仅供临床参考,最终诊断应紧密结合其他临床指标综合考虑。

结核分枝杆菌具有传染性,使用本试剂盒检测结核分枝杆菌核酸,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,具备相关的试验操作资格,实验室应具有相应的生物安全防护条件。

[检验原理]

本试剂盒采用煮沸法快速释放经 NaOH 液化后的痰液样本中结核分枝杆菌 DNA,采用荧光探针实时 PCR 技术,在结核分枝杆菌的 IS6110 基因保守区域设计特异性引物探针,探针的报告荧光基团为 FAM,淬灭荧光基团为 TAMRA,同时设置内标体系,设计内标特异性引物探针,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 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,从而对结核病患者痰液样本中的结核分枝杆菌核酸实现定性检测,为结核病的诊治提供辅助手段。

试剂盒核酸反应液中含有 UNG 酶(Uracil - DNA Glycosylase, 尿嘧啶-DNA 糖基化酶)防污染体系,可避免 PCR 产物污染造成的假阳性。

[主要组成成分]

编号	组成成分(32 人份/盒)	规格	数量	主要成分
1	核酸提取液	2 mL/瓶	1 瓶	Tris, NaOH, Triton X-100, HCl 构成
2	核酸反应液	900μL/瓶	1 瓶	结核引物、探针,内标引物、探针, Taq 酶, UNG 酶、dNTP, dUTP
3	空白对照品	200μL/支	1 支	甘油生理盐水溶液
4	强阳性对照品	200μL/支	1 支	结核分枝杆菌重组菌、内标重组菌
5	弱阳性对照品	200μL/支	1 支	结核分枝杆菌重组菌、内标重组菌

注:不同批号试剂盒中各组份不可以互换。

需自备试剂:4%NaOH, PBS 缓冲液

需自备耗材:无 RNase 和 DNase Tip 头、一次性手套、1.5mL 无 RNase 和 DNase EP 管

[储存条件及有效期]

本试剂盒储存于-18℃以下的条件下有效期 12 个月(请于有效期内使用)。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、有效期至:见标签。

[适用仪器]

ABI7300 荧光定量 PCR 仪/ ABI7500 荧光定量 PCR 仪/ Roche LightCycler 480 实时荧光定量 PCR 仪。

[样本要求]

1. 采集:

痰液少者，让患者在晨起后漱口，然后做深呼吸数次，将痰从肺部咳出，收集在干净容器内尽快送检。痰液多者，则先嘱患者轻咳，将滞留在气管内陈旧痰咳出弃去；然后深呼吸数次从肺部深处咳新鲜痰液，立即送检。无痰者，可去医院进行雾化吸入法引痰，然后送检。

2. 存放

待测样本在 2~8℃ 保存不应超过 24 小时；-18℃ 以下保存不超过三个月；-70℃ 以下长期保存。应避免反复冻融。

3. 运输

必须采用冷藏方式运输。

[检验方法]

1. 样本处理

煮沸法：

- 痰液中加入 4 倍体积的 4%NaOH（取样时用震荡器混匀后吸取，须使用剪刀将枪头嘴部剪去一截后高压灭菌处理），摇匀，37℃ 孵育 30min 液化，13,000rpm 离心 15min。去上清，沉淀加无菌 PBS 缓冲液 1mL 打匀，同时将强阳性对照品，空白对照品、弱阳性对照品分别取 50μL。将对照品及样本 13,000rpm 离心 10min，弃上清，再重复一次。
- 向样品管中各加入 50μL 核酸提取液，震荡 2min。
- 沸水煮沸或干浴 10min，13,000rpm，离心 10min，取上清 5μL 做 PCR 反应。

2. 扩增试剂准备

从试剂盒中取出核酸反应液，振荡均匀，2,000rpm 离心 10sec。计算需准备样品数 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）。按每管 25μL 分别加入反应管中，转移至样本处理区。

3. 加样

若样本及对照品裂解产物保存在-18℃ 以下或-70℃ 以下，使用前置室温解冻，以 13,000 rpm 离心 5 min。在所设定每个反应管中分别加入步骤 1 中处理过的样品、空白对照品、强阳性对照品和弱阳性对照品各 5μL，压紧管盖，2,000 rpm 离心 10 sec。将反应管放入荧光 PCR 检测仪内，记录样本摆放顺序。

4. PCR 扩增

循环条件设置：

ABI7300 荧光定量 PCR 仪，ABI7500 荧光定量 PCR 仪，Roche480 荧光定量 PCR 仪的程序设置：50℃ 反应 2 min → 95℃ 反应 5min → 95℃ 15s，60℃* 45s，(60℃ 收集荧光信号) 循环 40 cycles。

仪器检测通道选择：

ABI7300 荧光定量 PCR 仪与 ABI7500 荧光定量 PCR 仪选择 FAM（结核分枝杆菌）和 VIC（内标）通道(FAM 通道：Reporter: FAM, Quencher: TAMRA; VIC 通道：Reporter: VIC, Quencher: TAMRA;)，具体检测通道设置参照各仪器使用说明。

Roche LightCycler480 荧光定量 PCR 仪选择 FAM（结核分枝杆菌）和 HEX（内标）通道(FAM 通道：Reporter: FAM, Quencher: TAMRA; HEX 通道：Reporter: HEX, Quencher: TAMRA;)，具体检测通道设置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。

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

6.1 空白对照品：Ct 值为无数值或 0；

6.2 弱阳性对照品：结核 Ct 值 $30 \leq Ct \leq 38$ ，内标 Ct 值 $30 \leq Ct \leq 35$ ；

6.3 强阳性对照品：结核 Ct 值 ≤ 26 ，内标 Ct 值 $Ct \leq 26$ 。

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]

确定本试剂盒的阳性样本参考值为 FAM 通道检测的 Ct 值 ≤ 38 ，FAM 通道检测的 $38 \leq Ct < 40$ 为灰度区；VIC/HEX 通道检测的 Ct 值 ≤ 35 。该结核分枝杆菌检测参考范围根据临床样本 Ct 值制作 ROC 曲线确定，内标检测参考范围根据临床样本 Ct 值百分比置信区间法确定。

[检测结果的解释]

1. 如果检测样本的内标扩增曲线不呈 S 型曲线，Ct 值为 0 或无数值时，该样本检测无效，需重新提取检测。
2. 如果内标 Ct 值为 $Ct \leq 35$ ，检测 MTB 扩增曲线呈 S 型曲线，Ct 值 ≤ 38 ，为 MTB 检测阳性。
3. 如果内标 Ct 值为 $Ct \leq 35$ ，检测 MTB 扩增曲线不呈 S 型曲线，Ct 值为 0 或无数值时，为 MTB 检测阴性。
4. 如果内标 Ct 值为 $Ct \leq 35$ ，检测 MTB 扩增曲线呈 S 型曲线，Ct 值 > 38 时，需重新检测。若重新检测的 Ct 值 > 38 ，则报告为检测阳性；若重新检测的 Ct 值为 0 或无数值时，为检测阴性。

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：服用抗病原体药物等，④患者为非结核分枝杆菌的其它病毒或细菌引起的感染。

[检验方法的局限性]

1. 本试剂盒的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、运送及处理、样本中细菌含量过低有可能导致假阴性结果；样本中残留的蛋白成分对于 PCR 有抑制作用，容易出现假阴性结果。因此，提取过程请勿将白色沉淀物质吸入。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，也很容易出现假阳性结果。因此，PCR 临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。

[产品性能及指标]

1. 特异性（阴性参考品符合率）
检测国家阴性参考品，对 15 份阴性参考品的检测结果无假阳性。
2. 准确性（阳性参考品符合率）
检测国家阳性参考品，对 15 份阳性参考品的检测结果无假阴性。
3. 灵敏度
使用本试剂盒检测国家最低检出量参考品 S1~S4，S1~S4 分别为 10^3 个菌/mL、 10^2 个菌/mL、 10^1 个菌/mL、 10^0 个菌/mL，S1~S3 均可以检出。
4. 精密度
检测国家精密度参考品(J1~J10)，各检测 1 孔，批内不精密度达 FAM 通道 $CV \leq 5.0\%$ ($n=10$)。
5. 分析特异性
经验证，本试剂盒与其他非结核分枝杆菌如土分枝杆菌、海分枝杆菌等及其他病原体如肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、表皮葡萄球菌等均无交叉反应；且常见的结核治疗药物如异烟肼、利福平、卡那霉素等对样本中结核分枝杆菌核酸的检测结果无影响。

表 1 经验证无交叉反应的其他病原体

肺炎链球菌 (10^6 CFU/mL)	金黄色葡萄球菌 (10^6 CFU/mL)
流感嗜血杆菌 (10^6 CFU/mL)	诺卡氏菌 (10^6 CFU/mL)
大肠杆菌 (10^6 CFU/mL)	绿脓杆菌 (10^6 CFU/mL)
表皮葡萄球菌 (10^6 CFU/mL)	白色念珠菌 (10^6 CFU/mL)

人流感病毒 (A 型和 B 型) (10^5 PFU/mL)	人类副流感病毒 (1、2 和 3 型) (10^5 PFU/mL)
隐球菌 (10^6 CFU/mL)	堪萨斯分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
海分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	苏加分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
土地分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	龟分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
次要分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	偶发分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
溃疡分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	耻垢分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
戈登分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	脓肿分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
蟾蜍分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	胃分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
鸟分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	胞内分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)
瘰癧分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)	草分枝杆菌 (10^6 CFU/mL)

表 2 经验证检测结果不受干扰的外源性药物及最高浓度

异烟肼 (100mg/L)	乙胺丁醇 (5 μ g/mL)
利福平 (10 μ g/mL)	吡嗪酰胺 (200 μ g/mL)
卡那霉素 (50 mg/L)	链霉素 (50 μ g/mL)
阿莫西林 (200 mg/L)	病毒唑 (5000 μ g/mL)
肾上腺素 (1 mg/L)	地塞米松 (200 μ g/mL)
莫匹罗星 (0.5 mg/L)	

6. 临床试验数据总结

本试剂盒于北京胸科医院、中国人民解放军第三零九医院和苏州大学附属第一医院进行了临床试验，共计检测样本 666 例，结果显示与对比试剂阳性符合率为 98.74%，阴性符合率为 98.51%，总符合率为 98.64%，Youden 指数为 97.25%，配对 t 值检验分析 $p=0.739>0.05$ ，表明试剂盒与对比方法相比检测结果没有显著性统计学差异，一致性良好。

[注意事项]

1. 结核分枝杆菌样品具有传染性，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 and 生物安全条例，进行样本处理时必须做好相关的保护措施，以确保实验人员安全。
2. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194 号，或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。
3. 本试剂盒仅适用于体外检测。
4. 实验区域请严格分区操作：
第一区：PCR 前准备区—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。
5. 各区物品均为专用，不得交叉使用，避免污染；实验后请立即清洁工作台。
6. 试剂盒内各试剂使用前，充分融化并振荡均匀后离心。
7. 在 -18°C 以下或 -70°C 以下保存的样品裂解产物，应在加样前置室温解冻，短暂离心后使用。
8. 分装有反应液的反应管应扣盖或装入密室袋内再转移至样本处理区。
9. 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。
10. 扩增完毕立即取出反应管，密封在专用塑料袋内，灭菌后丢弃于指定地点。
11. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。
12. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 84 消毒液的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
13. 工作台及各种实验用品定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精或紫外灯进行消毒。
14. 实验中所用的离心管、Tip 头必须保证无 RNase 和 DNase。
15. 实验中所用过的离心管、Tip 头必须无害化处理。

16. 各区域内必备物品一览表（仅供参考）

PCR 前准备区	样本处理区	检测区
1. 离心机	1. 离心机	1. 荧光 PCR 检测仪
2. 混匀器	2. 混匀器	2. 紫外灯
3. 冰箱（4℃、-20℃）	3. 冰箱（4℃、-20℃）	3. 专用工作服、办公用品、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、离心管和玻璃器皿	6. 消耗品：一次性手套，带滤芯吸头、离心管和玻璃器皿	
7. 紫外灯	7. 紫外灯	
8. 专用工作服和办公用品	8. 专用工作服和办公用品	

【参考文献】

1. 程实, 陈伟, 陈颖钰, 陈军, 苗北平, 郭爱珍. 结核分枝杆菌复合群四重 PCR 检测方法的建立及应用. 中国人兽共患病学报 2012;333-7.
2. Köser CU, Feuerriegel S, Summers DK, Archer JAC, Niemann S. Importance of the Genetic Diversity within the Mycobacterium tuberculosis Complex for the Development of Novel Antibiotics and Diagnostic Tests of Drug Resistance. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2012;56:6080-7.
3. Cook JL. Nontuberculous mycobacteria: opportunistic environmental pathogens for predisposed hosts. British medical bulletin 2010;96:45-59.

【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：

邮 编：101300

电 话：86-10-80492001

网 址：www.gbi.com.cn

传 真：86-10-80492118

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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173403160

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2017 年 04 月 10 日

修改日期：2018 年 07 月 18 日