

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（实时荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（实时荧光 PCR 法）

【包装规格】

24 测试/盒（货号：801068、801076、801089）

48 测试/盒（货号：801007）

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌复合群（MTBC）核酸。

结核分枝杆菌复合群包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。结核分枝杆菌是引起人类结核病的主要病原菌，少数人类结核病则可由牛分枝杆菌引起，非洲分枝杆菌致病力较弱，是热带非洲人结核病病原体，田鼠分枝杆菌则对人类无致病性。IS6110 基因是结核分枝杆菌复合群特有的靶基因，其在不同菌株中拷贝数也不尽相同，变化大约为 10~25 拷贝不等。本试剂盒采用实时荧光 PCR 法对 IS6110 基因进行检测，适用于临床上结核病的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 方法检测结核分枝杆菌复合群特异的 IS6110 基因，其基本原理是：在 PCR 体系中加入两端分别标记有荧光基团与淬灭基团的寡核苷酸探针，在 PCR 扩增的过程中扩增出与探针序列互补的产物序列，同时实时监测荧光值的变化，通过扩增信号的有无判断是否存在结核分枝杆菌。同时在体系中加入外源内控，对扩增体系进行质量控制。

【主要组成成分】

1. 货号 801068 和 801076 的试剂盒主要组成成分

试剂盒组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	结核分枝杆菌 PCR 反应管	引物、探针（1 条 FAM 标记探针, 1 条 HEX 标记探针）、dNTP/dUTP Mix、Taq 酶、UNG 酶、内控模板	4 测试/袋	6 袋
对照试剂	结核分枝杆菌 阳性对照	质粒 DNA	2 测试/管	2 管
	结核分枝杆菌 阴性对照	不含靶基因的溶液（Tris、EDTA•2H ₂ O 钠）	2 测试/管	2 管

2. 货号 801089 的试剂盒主要组成成分

试剂盒组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	结核分枝杆菌 PCR 反应管	引物、探针（1 条 FAM 标记探针, 1 条 HEX 标记探针）、dNTP/dUTP Mix、Taq 酶、UNG 酶、内控模板	4 测试/条	6 条
对照试剂	结核分枝杆菌 阳性对照	质粒 DNA	10 测试/管	1 管
	结核分枝杆菌 阴性对照	不含靶基因的溶液（Tris、EDTA•2H ₂ O 钠）	10 测试/管	1 管

3. 货号 801007 的试剂盒主要组成成分

试剂盒组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	结核分枝杆菌 PCR 反应管	引物、探针（1 条 FAM 标记探针, 1 条 HEX 标记探针）、dNTP/dUTP Mix、Taq 酶、UNG 酶、内控模板	8 测试/条	6 条
对照试剂	结核分枝杆菌 阳性对照	质粒 DNA	10 测试/管	1 管
	结核分枝杆菌 阴性对照	不含靶基因的溶液（Tris、EDTA•2H ₂ O 钠）	10 测试/管	1 管

注：建议不同规格、批号的试剂盒组分之间不互换。

核酸提取纯化试剂未包含在本试剂盒中。使用厦门致善生物科技股份有限公司的核酸提取纯化试剂(备案号：闽厦械备 20150019 号或闽厦械备 20210346 号)。

【储存条件及有效期】

2~8℃避光保存，有效期为 18 个月。

试剂盒内各组分有效期与试剂盒相同。拆封后未使用的反应管应于 2~8℃避光干燥保存，并在一周内使用。运输须保持在 2~30℃条件下，运输时间不超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

本试剂盒实时扩增分析可使用带有 FAM 和 HEX 检测通道的实时荧光 PCR 仪，已验证的适配机型有 SLAN-96、SLAN-48P、ABI 7500 和 Fscan 48S，以及全自动医用 PCR 分析系统（型号 Sanity 2.0）。

【样本要求】

采集：以清晨第一口痰为宜。先用清水漱口，从肺深部咳出痰液，用无菌 5mL 玻璃管收集 1~3mL，密闭送检。

标本的保存和运送：标本需经 4%NaOH 溶液液化后提取核酸用于测试（见样本 DNA 提取部分）；样本在 2~8℃保存不超过 24 小时；-20℃保存，不超过 3 个月；应避免反复

冻融。标本运送依据原卫生部令第 45 号《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》。

【检验方法】

（一）适用于普通实时荧光 PCR 系统的操作方法

1：样本 DNA 提取——提取区

样本 DNA 提取前需进行液化，将痰液标本加到 50mL 带螺旋盖子的试管中，加入 4 倍体积的 4% NaOH 溶液，拧紧螺旋盖并振荡混匀 30s，然后室温放置 15min，期间震荡数次，以保证痰液能完全液化。液化后采用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 820 结核分枝杆菌核酸提取试剂盒进行提取。

2：样本加样——提取区

- ① 首先将泡罩包装的试剂条从试剂盒中取出，撕开包装取出当次实验需要的反应管，拆封后剩余的反应管立即用铝箔自封袋密封于 2~8℃ 避光干燥保存。
- ② 用移液器向每支 PCR 反应管中加入相应的提取样品或阴/阳性对照品 30 μL，盖严管盖并充分震荡混匀 20 秒。（阴/阳性对照品在第一次使用前需加入 300 μL 双蒸水进行溶解，溶解后的阴/阳性对照于-18℃ 以下贮存。）
注：PCR 反应管中已预先加入外源基因扩增片段的线性质粒作为内标，从而可以对扩增体系进行质量控制。当扩增体系发生抑制或发生其他特殊情况时，内标可以很好地起到指示作用从而避免造成假阴性的判读结果。
- ③ 将已加入模板的 PCR 反应管转移至 PCR 扩增区。

3：PCR 扩增——扩增区

① 仪器的程序设定如下：

体系	本试剂盒反应体系设为 30μL		
PCR 反应程序	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	50℃ 2 分钟	1
	预变性	95℃ 10 分钟	1
	Touchdown 循环程序	95℃ 10 秒	10
		71℃ 15 秒(每个循环下降 1℃)	
		78℃ 15 秒	
	PCR 循环 程序	95℃ 10 秒	45
		61℃ 15 秒（FAM 和 HEX）	
		78℃ 15 秒	

② 程序运行完毕，将 PCR 反应管（闭管）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

4：结果分析条件设定

基线（baseline）设定：一般以仪器默认为准，当出现少数标本扩增曲线的噪声阈值太大等特殊情况时可适当调整。

阈值（threshold）设定：原则上使阈值线刚好超过正常阴

性对照品 FAM 通道无规则噪音线的最高点即可。

一般情况下，SLAN-96P/S、SLAN-48P、Fascan 48S 按仪器默认设置判读即可。

ABI 7500 仪器基线（baseline）的确定：取 3-15 或 6-15 个循环的荧光信号。阈值（threshold）设定除按上述原则外，建议范围为 1000-1500，也可根据仪器本身的实际情况加以调整。

（二）适用于一体机分析系统的操作方法

1：样本预处理

样本 DNA 提取前需进行液化，将痰液标本加到 50mL 带螺旋盖子的试管中，加入 4 倍体积的 4% NaOH 溶液，拧紧螺旋盖并振荡混匀 30s，然后室温放置 15min，期间震荡数次，以保证痰液能完全液化。液化后采用厦门致善生物科技股份有限公司的 Sanity 2.0-结核 DNA 型核酸提取纯化试剂配套全自动医用 PCR 分析系统 Sanity 2.0 进行提取。

2：试剂准备

从核酸提取试剂盒中取出提取试剂，扫描试剂表面的二维码，仪器界面显示提取试剂信息，确认提取试剂信息；从检测试剂盒中取出装有结核分枝杆菌 PCR 反应管的铝箔袋，扫描铝箔袋上的条形码，仪器界面显示检测试剂信息，确认信息无误；再将提取试剂和结核分枝杆菌 PCR 反应管放入全自动医用 PCR 分析系统 Sanity 2.0 上对应的位置。

3：样本的检测（仪器的操作请参照仪器的说明书进行）

全自动医用 PCR 分析系统 Sanity 2.0 为封闭系统，加入待测样本后仪器可自动连续完成核酸提取、移液、PCR 扩增及结果分析等过程。

① 加样

1）待测样本加样：首先扫描样本的条形码（也可采用手动录入样本信息），确认仪器显示界面样本信息无误。然后按照提取试剂盒说明书中的操作方法进行操作，加入 300μL 的待测样本至对应的提取加样孔。

2）阴阳性对照加样：手动在样本信息位置录入“POS”或“NEG”（阳性对照代号：POS，阴性对照代号：NEG。），取 120 μL 的阴性或阳性对照加入提取试剂加样孔，参与全流程提取检测。（阴/阳性对照品在第一次使用前需加入 300 μL 双蒸水进行溶解，溶解后的阴/阳性对照于-18℃以下贮存。）

② 仪器运行

按照全自动医用 PCR 分析系统 Sanity 2.0 的说明书进行操作，完成运行检测和打印检测报告。

4: PCR 扩增程序

全自动医用 PCR 分析系统 Sanity 2.0 内部预录入 PCR 反应程序, 无需人工手动设置。PCR 程序与普通实时荧光 PCR 系统检测程序相同。

5: 质量控制

首次操作试剂盒时, 建议使用阴/阳性对照进行质量控制, 从而质控仪器运行、实验环境和人员操作。当对操作环境洁净度存疑时, 可再次使用阴/阳性对照进行质量控制。阴/阳性对照是否质控合格由软件自动根据预录参数进行。若阴/阳性对照质控合格, 则可进行样本检测; 若阴/阳性对照质控不合格, 建议排查原因后重新进行质控, 质控合格后才可进行样本检测。

【参考区间】

1. SLAN-96P/S、SLAN-48P、Fascan 48S、Sanity 2.0 仪器上:

FAM 通道: 阳性对照有扩增信号, Ct 值<18.5;

阴性对照无扩增信号。

HEX 通道: 阳性/阴性对照品有扩增信号, Ct 值<24.5。

2. ABI7500 仪器上:

FAM 通道: 阳性对照有扩增信号, Ct 值<16;

阴性对照无扩增信号。

HEX 通道: 阳性/阴性对照有扩增信号, Ct 值<24。

【检验结果的解释】

通过待检测样品所得到的扩增曲线 Ct 值来判断样品中是否含有结核分枝杆菌。FAM 通道为目的基因的检测通道, HEX 通道为内控的检测通道。

SLAN-96P/S、SLAN-48P、Fascan 48S、Sanity 2.0: 检测样品在 FAM 通道所得 Ct 值≤25 则判断为阳性; Ct 值>25 或者无扩增信号则可以认定为阴性。检测样品在 HEX 通道所得 Ct 值<26。

ABI 7500: 检测样品在 FAM 通道所得 Ct 值≤21 则判断为阳性; Ct 值>21 或者无扩增信号则可以认定为阴性。检测样品在 HEX 通道所得 Ct 值<25。

关于结果判读有以下几种情况: ①FAM 通道和 HEX 通道都为阳性, 可判读为阳性; ②FAM 通道为阳性, HEX 通道为阴性, 可判读为阳性(目的基因的扩增压制了内控的扩增); ③FAM 通道为阴性, HEX 通道为阳性, 可判读为阴性; ④FAM 通道为阴性, HEX 通道为阴性或 Ct 值大于对应的参考值时, 提示扩增发生了抑制, 导致目的基因和内控均无信号, 这种情况建议将模板进行提纯或者适当稀释(如稀释 5 倍)再进行检验。

实验室环境污染、试剂污染、样品交叉污染会出现假阳性结果; 试剂运输、保存不当或试剂配制不准确会引起试剂检测

效能下降, 出现假阴性或检测不准确的结果。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于定性检测结核分枝杆菌, 检测结果不作为定量分析的依据。
2. 不合理的样本采集、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
3. 阴性结果不能完全排除结核分枝杆菌的存在, 样本中菌株细胞过少、过度降解、基因缺失或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。
4. 待测靶基因的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。
5. 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 对国家参考品进行检测: 阴性参考品和阳性参考品符合率均为 100%; 最低检出量参考品 S₁、S₂ 和 S₃ 可检出, 且检测结果为阳性; 重复性参考品全部可检出, 结果均为阳性, 且 CV(%) 不高于 3%。
2. 试剂盒最低检出限为: 1×10¹ 菌/mL。
3. 分析特异性: 1) 交叉反应: 对出现在相应临床标本中可能产生交叉反应的常见病原体(包括: 鸟分枝杆菌、土分枝杆菌、施氏分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、亚洲分枝杆菌、戈登分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、龟脓分枝杆菌、偶然分枝杆菌、草分枝杆菌、肺炎分枝杆菌、苏加分枝杆菌、海分枝杆菌、龟分枝杆菌、次要分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、胃分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、胞内分枝杆菌、北京棒杆菌、嗜肺军团菌、百日咳伯德特氏菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、巴西诺卡氏菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、表皮葡萄球菌、白色念珠菌、隐球菌、肺炎克雷伯菌、肺炎链球菌、人类副流感病毒 1 型、人类副流感病毒 2 型、人类副流感病毒 3 型、鼻病毒、人流感病毒 A 型、人流感病毒 B 型、腺病毒、风疹病毒、带状疱疹病毒) 进行验证, 检测结果均为阴性; 2) 干扰物质: 样本中常见的干扰物质药物(包括: 利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、卡那霉素、链霉素、阿莫西林、扎那米韦、肾上腺素、地塞米松、莫匹罗星), 对检测结果均无影响。
4. 临床试验共检测 765 例痰样本, 本产品检测结果与中山大学达安基因股份有限公司的结核分枝杆菌核酸检测试剂盒(PCR-荧光法) 的检测结果的阳性符合率为 96.17%, 阴性符合率为 95.36%, 总符合率为 95.56%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断使用，操作人员必须经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，实验室应具备相关的生物安全防护设施及防护程序；试剂盒使用前请仔细阅读说明书全文。
2. 请严格按照基因扩增检验实验室的管理规范进行试验操作：如 PCR 试验严格分区操作；各区应有专用的手套、移液器等，不得交叉使用，避免污染；工作人员应遵循从一区到二区的单方向工作原则，各工作区相对隔离；进行 PCR 试验的工作桌面和及相关物品应定期用 1%次氯酸钠、75%酒精、1mol/L 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒。
3. 试验操作所需的消耗用品应一次性使用，使用前进行无菌处理。PCR 反应管经瞬时离心后，上机前应避免振摇，应注意检查各反应管是否盖紧，以免污染仪器。
4. 全部试剂应避光干燥保存，在普通实时荧光 PCR 系统上运行的试验均应设置阴/阳性对照品。
5. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
6. 溶解后的阳性对照应尽量避免反复冻融，如果需要多次使用，请在第一次溶解后将制品分装冻存，再根据需要取用。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：厦门致善生物科技股份有限公司

住所：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼

联系方式：电话 400-661-8810；0592-7615088

传真 0592-7615089

售后服务单位名称：厦门致善生物科技股份有限公司

联系方式：电话 400-661-8810；0592-7615088

传真 0592-7615089

生产地址：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼及 11 号楼 3 层 A 区

生产许可证编号：闽药监械生产许 20100283 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173403041

【说明书核准日期及修改日期】

2022 年 6 月 16 日