

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒 (PCR 荧光法) 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 (PCR 荧光法)

【包装规格】 32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人痰液中结核分枝杆菌复合群核酸，可作为临床结核病诊断的辅助手段。

适应症：由结核分枝杆菌感染引起的肺结核、肠结核、结核性腹膜炎等疾病。

【检验原理】

本试剂盒选用结核分枝杆菌保守基因片段设计特异引物及特异 Taqman 探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5’端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3’端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对结核分枝杆菌核酸的自动化检测。

【主要组成成分】

组成	组成成分	规格
核酸提取液	含 0.5% Triton-100、5%Chelex-100	1.8mL×1
结核分枝杆菌反应混合液	含三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq 酶	含 Taq DNA 酶及抗体	14μL×1
阳性对照品	主要成份为含结核分枝杆菌基因组 DNA(重组克隆)人工构建的质粒	100μL×1
阴性对照品	主要成份为 TE 缓冲液	100μL×1

注：不同批号试剂盒中各组份不可以互换。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃保存，有效期为 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，但试剂反复冻融不得超过三次。

生产日期和使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

具有 FAM 荧光通道的 ABI 7300 、ABI 7500 荧光 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 样本：人痰液。

2. 采集：将患者用力咳出肺深部的痰液采集于无菌样本保存管，密闭送检。采集具体方法请参考《微生物标本采集手册》一书。

3. 存放：2～8℃保存，不超过 24 小时；-20℃下保存，不超过 3 个月；-70℃下长期保存，但应避免反复冻融。

4. 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】

（1）在待测痰液中加入 4 倍体积的 4% NaOH，混匀，室温下放置 30min 至 1h 使其充分液化；

（2）取液化后的样本 0.5mL 于 1.5mL 离心管中加入 0.5mL 4% NaOH 后放置 10min，13,000rpm 离心 10min；

（3）弃上清，沉淀中加入 1mL 灭菌生理盐水，振荡混匀，13,000rpm 离心 10min，再重复洗涤一次；

（4）弃上清，沉淀中加入 50 μL 核酸提取液(内含固体沉淀颗粒物，为使颗粒均匀分布，每次取样时请用吸头反复吸打)，振荡混匀 15sec，100℃水浴或干浴 10min，然后 12,000rpm 离心 10min。取上清供 PCR 扩增用，或-20℃储存备用。

（5）阴性对照品、结核分枝杆菌阳性对照品直接取出 50 μL，加入 50 μL 核酸提取液，混匀后 100℃水浴或干浴 10min。12000rpm 离心 10min，备用。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中取出结核分枝杆菌反应混合液在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算所需反应试剂人份数 n[n=样本数+对照数（2）]，每人份反应体系配制如下：

组分	结核分枝杆菌反应混合液	Taq 酶	总体积
体积	35.6 μL	0.4 μL	36 μL

按 n 人份计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中，混匀。按 36 μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

单个反应总体积为 40 μL，因此往上述分装有 36 μL 反应液的 PCR 薄壁管中按顺序分别加入 4 μL 的结核分枝杆菌阳性对照品、4 μL 阴性对照品、4 μL 样品处理上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 检测区】

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循 环 数	温 度	时 间
1	1	95℃	3min
2	40	94℃	15sec
		60℃	30sec

检测荧光选择：请选择 FAM 荧光。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。阳性对照 Ct 值应小于 38，阴性对照 Ct 无数值；在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

1. 检测样本 Ct 值无数据时，报告为阴性。
2. 检测样本 Ct ≤ 38.0 者判为阳性。
3. 检测样本 Ct > 38.0 为实验灰度区，需要重复实验一次，取该样本核酸提取上清液 4 μL 加入配制好的反应液进行再一次检测，重做结果该样本 Ct 值 < 40 则为阳性，否则为阴性。

【检验方法的局限性】

检测结果不能直接作为临床确诊或排除病例的依据，仅供临床医生参考使用。

【产品性能指标】

1. 灵敏度：本试剂盒的产品最低检出限为 500copies/mL。
2. 特异性：本试剂盒与呼吸道合胞病毒、流感病毒、副流感病毒、链球菌、肺炎支原体（MP）、肺炎衣原体（CP）、葡萄球菌以及沙门杆菌等主要的呼吸道病原体样本无交叉反应。
3. 精密度：一份弱阳性的样本连续重复 10 次检测，其 CT 值的 CV 值小于 10%。
4. 抗干扰性：含有血红蛋白的临床样本对本试剂盒不会产生任何的干扰。
5. 境内临床研究以深圳匹基生物工程有限公司生产的结核分枝杆菌（TB）核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）作为对照，共检测痰液样本 567 份，结果显示阳性符合率为 99.62%，阴性符合率为 97.70%，总符合率为 98.59%。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 实验室严格分区操作：
第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂。
第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理。
第三区：PCR 检测区-PCR 扩增检测。
4. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
5. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
6. 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，以免荧光物质泄露污染仪器。

7. 加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
8. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
9. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
10. 工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
11. PCR 反应混合液应避光低温保存。
12. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986 - 994.
5. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026 - 1030.
6. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

住所：杭州市西湖区振中路 210 号

联系方式：电话：0571-87775858 传真：0571-87775851

售后服务单位名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

联系方式：电话：400-118-2266 传真：0571-87775851

生产地址：杭州市西湖区振中路 210 号；杭州市临安区开源街 8 号 3 幢（仓库地址）

生产许可证编号：浙食药监械生产许 20120007 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163402547

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2021.07.08

修改日期：2022.06.15