

结核分枝杆菌乙胺丁醇耐药突变检测试剂盒（荧光PCR熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌乙胺丁醇耐药突变检测试剂盒（荧光PCR熔解曲线法）

【包装规格】

48测试/盒

【预期用途】

本产品用于对结核分枝杆菌复合群的分离培养物进行乙胺丁醇耐药突变检测。

本产品为定性检测试剂，检测区域为*embB*基因306位密码子（突变频率：61.3%~72.7%^{〔1,2,3〕}）、406位密码子（突变频率：7.5%~23.5%^{〔1,2〕}）和497位密码子（突变频率：12.9%~29.4%^{〔1,2〕}），检测位点对乙胺丁醇耐药检测的覆盖率为72.7%~80.6%^{〔1,2〕}，检测对象为分离培养的结核分枝杆菌。其分离培养可以是固体培养或液体培养。

结核病是由结核分枝杆菌感染引起的慢性传染病，本产品适用于临床上对结核分枝杆菌乙胺丁醇耐药基因的定性检测，以辅助结核病临床诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光PCR熔解曲线法，根据靶序列与探针杂交产物熔点的差异检测结核分枝杆菌*embB*基因306位、406位、497位密码子的突变，建立双管双色检测体系。

其基本原理是（图1）：在PCR体系中加入两端分别标记有荧光基团与淬灭基团的探针，在PCR过程中扩增出与探针序列互补的单链寡核苷酸序列，在扩增完成后增加熔解曲线分析过程，同时实时监测荧光值的变化。通过计算荧光值与温度的负导数，可获得探针与该序列杂交产物的熔解曲线，并得出熔点（ T_m 值），从而推得该序列突变信息。如果靶序列与探针完全匹配，则探针与该序列杂交的熔点最高；如果探针与序列不完全匹配，例如序列发生点突变、插入或者缺失，则探针与该序列杂交的熔点低于探针与完全匹配序列杂交的熔点。熔点的降低程度与点突变类型、插入或缺失碱基数量以及突变位点的位置有关。

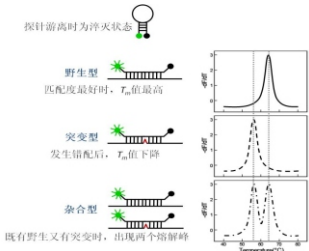


图1 荧光PCR熔解曲线法基本原理

【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	EMB PCR混合液 A(EMB PCR Mix A)	引物、探针、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP/dUTP混合液）	1060 μL/管	1管
	EMB PCR混合液 B(EMB PCR Mix B)	引物、探针、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP/dUTP混合液）	1060 μL/管	1管
	TB 酶混合液	耐热DNA聚合酶（Taq酶）、尿嘧啶DNA糖基化酶（UNG酶）	45 μL/管	1管
对照试剂	EMB 阳性对照	含四个野生型扩增靶基因的质粒	120 μL/管	1管
	TB 阴性对照	不含靶基因的溶液（三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸二钠、聚乙二醇辛基苯基醚）（Tris、EDTA-2Na、Triton X-100）	120 μL/管	1管
提取试剂	TB DNA提取液	三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸二钠、聚乙二醇辛基苯基醚（Tris、EDTA-2Na、Triton X-100）	14 mL/管	1瓶

【储存条件及有效期】

-18℃以下避光保存，有效期12个月。

试剂盒内各组件有效期与试剂盒相同。反复冻融建议不超过3次。建议采用4℃以下温度运输。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

本产品适用于带有FAM和TET检测通道且具有熔解曲线分析功能的实时PCR扩增仪，包括：Bio-Rad CFX96实时荧光PCR扩增仪、全自动医用PCR分析系统(SLAN-96S)。

【样品要求】

1：新鲜痰液样品的固体培养物

① 样品采集

采用世界卫生组织（WHO）推荐的国际通用螺旋盖痰瓶，或可密封塑料盒、蜡纸盒收集痰液样本。痰容器应标明病人姓名、编号（出诊病人门诊序号或随访病人登记号）、检查项目和容器序号1、2、3（1=当日即时痰，2=夜间痰，3=次日晨痰）。无痰患者可采用雾化引痰采集样本。患者留取的痰液样本，应由检验人员或经培训的专人目视检查样本质量：样本量一般在3~5mL，样本形状属于干酪痰、褐色血痰或含少量新鲜血液的血痰、粘液痰者为合格的样本；痰液样本不合格者，如唾液样本，应在进一步指导后重新送检。

② 样本运输

运输包装按国际民航组织文件Doc9284《危险品航空安全运输技术细则》的分类包装要求，将相关病原和样本分为A、B两类，对应的联合国编号分别为UN2814和UN3373；A类中传染性物质特指菌株或活菌培养物，应按UN2814的要求包装和空运，其他相关样本和B类的病原和相关样本均按UN3373的要求包装和空运；通过其他交通工具运输的可参照以上标准包装。

③样本储存

结核分枝杆菌临床分离株培养物可保存于4℃，并于一个月用于检测，若无法在一个月检测，则刮取菌体后加入冻存液保存于-18℃以下。

④ 样本制备

NaOH法：将痰液标本加到50mL带螺旋盖子的试管中。视标本性状，加1~2倍体积4%NaOH消化液于痰管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡器上振荡1分钟，使痰液充分匀化，室温放置于生物安全柜内，约15~20分钟，待用。

⑤分离培养的方法

固体培养使用改良罗氏培养基。

用无菌滴管吸取消化后的痰液样本约0.1 mL均匀接种于2支酸性罗氏培养基斜面上。保持培养基斜面水平向上，放置于36±1℃恒温培养箱内孵育24小时后直立放置，36±1℃条件下继续孵育，接种后第3日和第7日各观察一次菌落生长情况，此后每周观察一次。发现菌落生长者，经抗酸染色证实为抗酸菌，可依据生长情况报告分枝杆菌培养阳性1+~4+或实际菌落数。阴性结果观察至第8周末，方可报告。每次观察后应记录观察结果。如发现培养基液化、或霉菌污染，则报告污染。

⑥菌种鉴定的方法

刮取菌龄2~3周的分枝杆菌培养物（刮取斜面各个部分培养物），放玻璃磨菌器内研磨，以0.5%吐温-80生理盐水稀释，与标准麦氏比浊管比浊，配成1mg/mL菌悬液。取1mg/mL菌悬液用0.5%吐温-80生理盐水逐步稀释至10³mg/mL菌悬液，取0.1mL分别接种PNB培养基1支，改良罗氏培养基1支。最终接种菌量为10³mg。36±1℃孵育，每周观察一次结果，同时记录PNB培养基和对照培养基上菌落生长情况直至孵育4周。快速生长的非结核分枝杆菌一周左右可见菌落；缓慢生长的分枝杆菌四周报告结果。结核分枝杆菌复合群在PNB培养基上不生长。

⑦对新鲜样本的处理方式

对于新鲜样本，NaOH法处理后即可接种，36±1℃培养。

⑧取样

取样时间：取对硝基苯甲酸（PNB）生长试验的对照管上的培养物，培养时间为4周。

取样方法：固体培养基上生长的结核分枝杆菌，用22SWG标准接种环收集细菌，注意尽可能刮取斜面各个部位的菌落，避免挑取1、2个单独菌落进行试验，刮取菌落的量以一环为宜，悬浮在250 μL TB DNA提取液中。

2：新鲜痰液样品的液体培养物

① 样品采集

同【样品要求】“1：新鲜痰液样品的固体培养物”的“样品采集”。

② 样本运输

同【样品要求】“1：新鲜痰液样品的固体培养物”的“样本运输”。

③ 样本储存

结核分枝杆菌临床分离株培养物可保存于4℃，并于一个月用于检测，若无法在一个月检测，则收集菌体后加入冻存液保存于-18℃以下。

④ 样品制备

NaOH法：将痰液标本加到50mL带螺旋盖子的试管中。视标本性状，加1~2倍体积4%NaOH消化液于痰管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡器上振荡1分钟，使痰液充分匀化，室温放置于生物安全柜内，约15~20分钟。而后打开离心管螺旋盖，向离心管中加入磷酸盐缓冲液，不超过40 mL，然后旋紧离心管螺旋盖，3000 g离心20分钟；在生物安全柜内打开离心管，小心弃去上清液至含消毒剂的废液缸中，加入2 mL磷酸盐缓冲液，在涡旋振荡器上涡旋离心管2~3秒，使沉淀物重悬，待用。

⑤分离培养的方法

液体培养使用BACTEC™MGIT™ 960全自动分枝杆菌培养仪。

培养基准备：将营养添加剂、杂菌抑制剂从冷藏环境中取出，室温下放置，检查MGIT生长指示管有无破损及污染（管中液体出现浑浊）；在MGIT培养管上标记样品编号、接种日期；待PANTA平衡到室温，使用15mL OADC将PANTA溶解，用移液器在每MGIT管内添加溶解后的0.8mL PANTA/生长添加剂混合物，注意操作不要污染管，盖紧MGIT管。

注意：该OADC与PANTA混合物在2~8℃可稳定保存5天。在保存前贴上标签，包括内容物、配制时间、有效期及配制人信息。

接种及培养：用无菌滴管吸取消化后的痰液约0.5 mL悬浮液加到MGIT管中，盖紧MGIT管盖子并充分混匀（上下轻柔颠倒一次）。一旦MGIT培养管通过仪器报告呈阳性，则应该准备涂片并使用萘-尼氏染色液进行染色，以后确定是否结核杆菌阳性。如果肉汤出现浑浊或污染，则不考虑抗酸杆菌涂片结果，使用血液琼脂，巧克力琼脂或TSI琼脂作为传代培养基，判断是否存在污染细菌。如果涂片呈抗酸杆菌阴性，培养管未被污染，（肉汤透明）则将培养管放入37℃培养箱中，7天后对涂片重新进行抗酸杆菌染色处理。若为阳性，则报告液体培养分枝杆菌阳性。若为阴性则报告液体培养阴性。

⑥菌种鉴定的方法

PNB生长试验：取1~2mL分枝杆菌培养阳性的液体培养基，加入到无菌试管中，以0.5%吐温-80生理盐水稀释，与标准麦氏比浊管比浊，配成1mg/mL菌悬液。取1mg/mL菌悬液用0.5%吐温-80生理盐水逐步稀释至10³mg/mL菌悬液，取0.1mL分别接种PNB培养基1支，改良罗氏培养基1支。最终接种菌量为10³mg。37℃孵育，每周观察一次结果，同时记录PNB培养基和对照培养基上菌落生长情况直至孵育4周。快速生长的非结核分枝杆菌一周左右可见菌落；缓慢生长的分枝杆菌四周报告结果。结核分枝杆菌复合群在PNB培养基上不生长。

⑦对新鲜样本的处理方式

同【样品要求】“1：新鲜痰液样品的固体培养物”的“对新鲜样本的处理方式”。

⑧取样

取样时间：仪器报阳后的第二天。若后续的菌种鉴定结果为非结核分枝杆菌复合群，则本试剂盒的检测结果无效。

取样方法：液体培养基中生长的结核分枝杆菌取1 mL，

10000 rpm 离心15分钟，弃去上清液并在250 μL TB DNA 提取液中重悬细菌。

【检验方法】

1：试剂准备——配液区

① 首先将所有的试剂从冰箱取出并平衡至室温。PCR 反应液配液标准为： 取n×19.6 μL EMB PCR Mix A和n×0.4 μL 酶混合液加入到1.5 mL离心管中，振荡混匀数秒，3000 rpm离心数秒； 另取n×19.6 μL EMB PCR Mix B和n×0.4 μL 酶混合液加入到另一1.5 mL离心管中，振荡混匀数秒，3000 rpm离心数秒。配好的PCR反应液必需贮存-18℃并在4小时内使用。

② PCR反应液的分装。PCR反应液A/B分别以每管20 μL 分装于PCR薄壁反应管。

③ 将配制好的PCR反应管装入凹口袋转移至提取间。 贮存在-18℃直至样本提取处理完毕。

2：样品提取及加样——提取区

① 固体培养基上生长的结核分枝杆菌，用22 SWG 标准接种环收集细菌1环，并悬在250 μL TB DNA提取液中。液体培养基中生长的结核分枝杆菌取1mL，10000rpm离心15分钟，丢弃上清并在250 μL TB DNA提取液中重悬细菌。

② 封口膜封口，99℃加热20分钟。14000 rpm离心10分钟，转移上清液到新的1.5 mL离心管。上清液即为PCR扩增模板。（模板可保存于-18℃，并于1个月内完成试验。注意不要反复冻融样品。）

③ 用微量加液器向每支PCR薄壁反应管中加入相应的提取样品或阴/阳性对照品5 μL。立即盖严管盖。

④ 将已加入模板的PCR薄壁反应管转移至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25 μL		
	阶段	条件	循环数
PCR反应程序	UNG处理	50℃ 2分钟	1
	预变性	95℃ 10分钟	1
	PCR循环程序	95℃ 15秒	55
		58℃ 15秒	
		74℃ 20秒	
熔解分析程序	95℃ 1分钟	1	
	35℃ 5分钟		
	40℃~85℃,设置在此阶段每0.5℃采集FAM和TET通道荧光信号		

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

【阳性判断值或者参考区间】

阳性对照，即野生型在各体系及各通道中的 T_m 值范围如下：反应体系A中FAM通道66.5℃±1℃；TET通道61.5℃±1℃。反应体系B中FAM通道64.5℃±1℃。

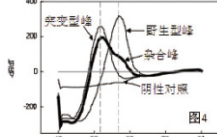
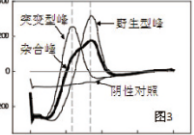
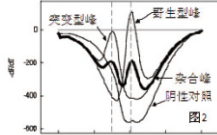
本说明书中 T_m 值是在特定Bio-Rad CFX96仪器上所得的常见值作为参考。当使用其它仪器时， T_m 值可能略有变动，以当次试验阳性对照（野生型）所得的 T_m 值为准。

T_m 值以仪器自动判读所得为准，当仪器给出一个以上 T_m 值时，请参考阳性对照和阴性对照的峰型选择有效 T_m 值。当出现仪器无法自动给出 T_m 值的情况时， 可通过调整基线或直接人工判读的方法获得 T_m 值。

【检验结果的解释】

通过比较所检测样品与阳性对照之间熔解曲线的熔点（ T_m 值）的差异判断样品是否发生突变。当四个通道中样品的熔点与阳性对照的熔点均一致（误差不超过1℃）时判定为野生型，试验菌株对乙胺丁醇敏感；样品的熔点低于阳性对照2℃及以上时（ $\Delta T_m \geq 2^\circ\text{C}$ ）判定为突变型，试验菌株对乙胺丁醇耐药。

关于杂合样品结果的判读：当四个通道中任一通道熔解曲线出现双峰或融合峰时即为杂合样品，分3种情况：① 当样品出现双峰时，即为杂合样品，如图2；② 样品为一个融合峰，与阳性对照的熔点一致，但峰型与阳性对照的峰型有较大差异，在有可能出现突变峰的位置出现小峰或突起，即为杂合样品，如图3；③ 样品为一个融合峰，为突变熔点，但在野生峰的位置出现小峰或突起，即为杂合样品，如图4。杂合样品对乙胺丁醇耐药，建议出现杂合样品时将样品重复检测，以确定样品耐药性。



阴性对照在结果判读中的意义：阴性对照加入的是不含模板的TB DNA提取液，可以质控样品在提取和加样操作过程中是否发生了空气中气溶胶的污染，若阴性对照出现熔解峰信号，则提示操作环境中可能有核酸污染。其次，当模板浓度较低时峰形比较低，可以作为低浓度模板判读时的依据。

若被检测样品出现无熔解峰的情况，说明该样品无有效信号。出现这种情况有几种可能的原因：1、样品中不含结核分枝杆菌或结核分枝杆菌样品进行提取后加入反应体系的量低于本产品的检测灵敏度；2、样品提取及加样实验操作失误。当以上情况出现时，需要对相应样品进行重新提取并再次检测。若阳性对照无熔解峰出现，在试剂准备和加样操作均正确的情况下，则表明试剂盒失效。

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. 本说明书仅涉及培养样品。

2. 由于本试验只是筛选核酸序列而不是氨基酸序列，因此，有可能那些不引起氨基酸改变的突变（沉默突变）也会被判定为突变型。

3. 如样品出现不均一耐药菌株，需要结合熔解曲线峰型具体判断突变比例。

4. 本试验仅检测结核分枝杆菌由 $embB$ 基因306位、406位、497位密码子突变引起的耐药，由其他基因或基因区引起的突变以及其他乙胺丁醇耐药机制引起的耐药本试验不能检测。

5. 若不均一耐药菌株中耐药菌的比例偏低时（耐药菌占总菌含量的40%以下），可能会导致熔解峰与阳性对照一致，试验菌株判定为对乙胺丁醇敏感，造成假阴性结果。

6. 本产品从方法学上不能区分具体突变位点，因此报告为突变的结果并不绝对表示耐药。同时，由于试剂盒检测位点未能覆盖所有乙胺丁醇耐药突变位点（检测区域对乙胺丁醇耐药检测的覆盖率为72.7%~80.6%），报告为未突变的结果并不绝对表示敏感。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒可对 $embB$ 基因306位、406位、497位密码子这些与乙胺丁醇耐药相关的基因进行突变检测。详见“预期用途”。

2. 野生型检测限、突变型检测限均为 1×10^4 菌/mL。

3. 可以检出含40%及以上突变株比例的不均一耐药菌株。

4. 本产品熔解峰 T_m 值的波动范围不超过 $\pm 1^\circ\text{C}$ 。

5. 本产品进行的临床试验共验证1199例固体培养基培养样品，研究结果表明，与药敏试验结果相比较，本产品的临床灵敏度（真阳性率）为85.59%，临床特异性（真阴性率）为95.39%。

6. 本产品进行的临床试验共验证223例液体培养基培养样品，研究结果表明，与药敏试验结果相比较，本产品的临床灵敏度（真阳性率）为86.67%，临床特异性（真阴性率）为95.71%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断使用，操作人员必须经过培训并具有一定的经验，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。试剂盒中各试剂充分融化后请短暂离心。反应液分装时应尽量避免产生气泡。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. 每次试验应设置阴阳性对照品。

5. PCR反应混合液应避光保存。

6. 尽量避免反复冻融，如果需要多次使用，请在第一次融解后将制品按适当量分装后保存。

7. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒打开。

【标识的解释】

1. PNB：对硝基苯甲酸

2. PANTA：杂菌抑制剂

3. OADC：生长营养添加剂

【参考文献】

1. Plinke C, Helen SC, Nana Z, *et al.* $embCAB$ sequence variation among ethambutol-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates without $embB$ 306 mutation. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010, 65(7): 1359-1367.

2. Park YK, Ryoo SW, Lee SH, *et al.* Correlation of the phenotypic ethambutol susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis* with $embB$ gene mutations in Korea. *Journal of Medical Microbiology*, 2012, 61(4): 529-534.

3. Plinke C, Sabine RG, Stefan N. Significance of mutations in $embB$ codon 306 for prediction of ethambutol resistance in clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2006, 50(5): 1900-1902.

【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

注册人住所：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

【医疗器械注册编号/产品技术要求编号】

国械注准20163401459

【说明书核准日期及修改日期】

2020年07月24日