



结核分枝杆菌核酸检测试剂盒（RNA 恒温扩增）

说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌核酸检测试剂盒（RNA 恒温扩增）

【包装规格】 20 人份/盒

【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核酸。

结核病是指由结核分枝杆菌（Mycobacterium Tuberculosis）复合群中的结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌和非洲分枝杆菌引起的慢性传染性疾病，可累及全身各个器官，其中尤以肺结核最为多见。目前，结核分枝杆菌的实验室检测方法有：痰涂片检查；结核分枝杆菌培养法；免疫法；核酸扩增法，如 PCR、TMA。该产品可用作结核分枝杆菌复合群的临床辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒的结核分枝杆菌核酸检测分为核酸提取和恒温扩增检测。

在核酸提取过程中，细菌经超声波破碎裂解释放出核酸 RNA。

核酸恒温扩增检测技术（Simultaneous Amplification and Testing, SAT）使用 M-MLV 反转录酶、T7 RNA 多聚酶和优化探针技术来同时实现。反转录酶用于产生靶标核酸（RNA）的一个 DNA 拷贝，T7 RNA 多聚酶从 DNA 拷贝上产生多个 RNA 拷贝，带有荧光标记的优化探针和这些 RNA 拷贝特异结合，从而产生荧光，该荧光信号可由检测仪器捕获。

检验结果根据实时荧光信号的出现时间和强度，结合阳性对照和阴性对照对检验结果进行判定。

【主要组成成分】

组成成分	包装盖颜色	规格	主要成分
稀释液	白	2×1.0mL	含核糖核酸酶抑制剂的溶液
检测液	棕	1×40μL	含 TB 特异引物、特异荧光探针
酶液	紫	1×200μL	含反转录酶，T7 聚合酶
反应液	黄	1×600μL	含脱氧核糖核苷三磷酸、核糖核苷三磷酸和扩增所需组份
阳性对照	红	1×50μL	含灭活的结核分枝杆菌菌液
阴性对照	绿	1×50μL	不含任何核酸，用于检验操作过程及试剂的有效性

注：请勿互换、混合或合并不同批号的试剂盒中的试剂。

【储存条件及有效期】

-35℃～-15℃（检测液要避光）保存，有效期 12 个月。

试剂盒避免反复冻融，打开包装使用后的试剂盒可于 2～8℃存放一个月。

生产日期及失效日期详见标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于具有恒温实时荧光检测功能的仪器，包括 ABI7300，

Bio-Rad iQ5，Stratagene Mx3005p，SLAN I 类 B 型。此外还需要超声波清洗器、高速离心机、恒温混匀仪。

具有恒温实时荧光检测功能的仪器在使用前需要进行校准。

【样本要求】

1. 适用样本类型：痰液。
2. 标本采集^[1]
以清晨第一口痰为宜。先用清水漱口，嘱患者用力咳出深部的痰于无菌样本保存管中，密封，即可送检，合格的痰标本应是脓样、干酪样或脓性黏液样性质的痰液，痰量以 3mL～5mL 为宜。
3. 保存：采集的样本在 2～8℃保存不超过 7 天（建议不超过 24 小时）。
4. 运输：密封冷藏（2℃～8℃）运输。

【检验方法】

1. 试剂准备
 - 1.1 使用前将所有试剂温度平衡到室温（18℃～26℃），充分混匀。试剂盒内各试剂在充分融解后请稍事离心。
 - 1.2 扩增检测液的准备
按照每个样品取 30μL 反应液和 2μL 检测液计算，配制所需扩增检测液，振荡混匀，3000～4000rpm 离心 10s 备用。例如：样本数为 n，则反应数即为 n+2（待测样本数+阴性对照+阳性对照），则配制扩增检测液的方法即为：（n+2）×30μL 反应液+（n+2）×2.0μL 检测液混匀。
2. 样品处理
 - 2.1 取痰液 1.5mL，视痰标本性状加入 1～2 倍体积的 4%NaOH 于无菌样品管中，涡旋振荡 1min，使痰液充分匀化，室温放置 15min～20min。
 - 2.2 样品处理管（1.5 mL 离心管，数量为：待测样本数+2），分别标记待处理样品编号及阳性、阴性对照；
 - 2.3 取液化好的痰液标本 1mL 于样品处理管中，13000rpm 离心 5min，弃上清；
 - 2.4 加入 1mL 生理盐水重悬洗涤，13000rpm 离心 5min，弃上清，加入 50μL 稀释液重悬，该样本即为待测样本。待测样本在 2～8℃保存不超过 3 天，-20℃或者-70℃冷冻保存不超过 3 个月。
- 2.5 阳性对照：取 2μL 阳性对照加入 198μL 稀释液中，混匀备用。
- 2.6 阴性对照：取 2μL 阴性对照加入 198μL 稀释液中，混匀备用。
3. RNA 提取
 - 3.1 将 50μL 待测样本及 50μL 样品准备 2.5、2.6 中制备的阳性对照和阴性对照超声处理 15min，超声功率为 300W。
 - 3.2 取 2μL 处理物加入含 30μL 扩增检测液的洁净微量反应管或反应板中。
4. 仪器准备
 - 4.1 干热恒温器调至 60℃±1℃；

- 4.2 将恒温混匀仪调至 42℃±1℃；
- 4.3 开启恒温荧光检测仪器，荧光素通道设定为 FAM；42℃ 1min，40 个循环；荧光信号收集每分钟进行一次，共检测 40 次；反应体系 40μL。ABI7300/7500 需要在新建文档的 Assay 下拉菜单中选择 Isothermal，Passive Reference 选择 none。
5. 扩增检测
- 5.1 将微量反应管置于恒温器上 60℃保温 10min；
- 5.2 取出微量反应管置恒温混匀仪上 42℃保温 5min；同时将酶液 42℃预热 10min；
- 5.3 保持微量反应管于 42℃恒温混匀仪上，向微量反应管中加入 10μL 已预热的酶液，立即盖上管盖或贴膜 1200rpm 震荡 15 秒钟混匀；
- 5.4 将微量反应管转至荧光检测仪器，立即启动反应程序；
- 5.5 反应结束后，直接将微量反应管取出浸泡于 10% 84 消毒液中，取微量反应管应小心操作，严禁打开反应管（防止污染反应区）！实验结束后用 10% 84 消毒液清洁工作区及用具，最后用清水擦拭干净。
6. 质量控制程序
- 6.1 应用临界弱阳性对照进行实验室质控
- 为了防止出现漏检（假阴性）的情况，SAT 检测实验室应定期应用临界弱阳性对照进行室内质量控制。
- 6.1.1 临界弱阳性对照的制备方法：将阳性对照用稀释液作 10000 倍稀释，即为临界弱阳性对照；
- 6.1.2 临界弱阳性对照的使用方法：取 50μL 临界弱阳性对照，放入超声波清洗器中进行超声处理 15min，超声功率为 300W，超声结束后，取 2μL 处理物加入含 30μL 扩增检测液的洁净微量反应管实验。
- 6.2 质量控制：所设置阳性对照、临界弱阳性对照和阴性对照的 dt 值应满足以下条件：阳性对照 dt≤临界弱阳性对照 dt≤35，阴性对照 dt 无数值或为 40；否则，实验视为无效需重新进行。
- 注：dt 表示样本曲线与阈值线交点的横坐标读数（与一般实时荧光 PCR 实验结果的 ct 值类似）。

【参考区间】

通过对本试剂盒的最低检测下限浓度 TB 菌（1CFU/反应）进行大量实验统计分析，并结合正常人样本和临床阳性样本的检测数据，确定 95%置信区间为：dt 值≤35，99%置信区间的 dt 值范围为：dt<40。

【检验结果的解释】

1. 阈值设定：以阈值线刚好超过正常阴性对照扩增曲线的最高点。
2. 结果判断：
dt≤35 的样本为阳性，
35<dt<40 的样本建议重新检测，检测结果 dt<40 的样本为阳性，
dt 无数值或为 40 的样本为阴性。

【检验方法的局限性】

1. 因为所有的微生物检测结果很大程度上依赖于标本的采集，所以一次的阴性结果并不能确定没有感染。

2. 阳性结果指示结核分枝杆菌的存在，但不能作为充分的临床诊断依据。临床的诊断需要实验室的检验结果与临床症状相结合。
3. 在 SAT 定性检测中，阳性判定值（dt）的建立，是在一定的统计学基础上，相对于某个具体的受检者来说，其有可能并不具备正确性。
4. 本试剂盒无法区分结核分枝杆菌复合群的相关菌属。

【产品性能指标】

1. 本产品的检测灵敏度为 1CFU/反应。
2. 以培养法为金标准、PCR 法为扩大金标准，本产品对临床痰液标本的检测敏感性为 95.06%，特异性为 97.85%。

【注意事项】

1. 在加酶之前，请确认仪器及程序设置已准备好并成功试运行！加酶之后 SAT 反应就立即开始，荧光检测需要马上开始。
2. 酶液在用之前要先离心，并将温度平衡至 42℃。
3. 操作过程的环境温度应控制在 18℃~26℃。
4. 试剂盒应避免反复冻融。
5. 本试剂盒仅用于体外诊断。
6. 检测液对光敏感，在储存期间和使用准备期间应避免曝光。
7. 由于本产品的检测靶标为 RNA，操作过程中应特别注意防止 RNase 对 RNA 的降解作用，所有使用的器皿、加样器等均为专用，离心管、吸头等一次性耗材在实验前应全部高压灭菌。在实验操作之前请操作人员戴上无粉手套、口罩，穿好实验服。
8. 所有临床样品都可能是潜在的污染源，操作应戴手套，使用过的试剂瓶，棉签等必需经无菌处理才可丢弃，进行分析操作时，应建立规范的器具操作和废物处理规程。妥善处置所有接触到标本和试剂的材料，彻底清洗并消毒所有操作台面。
9. 如果没有特别说明，请勿合并任何分析试剂或溶液。

【参考文献】

1. 《肺结核诊断标准》WS 288-2008

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海仁度生物科技股份有限公司
住所：上海市张江高科技园区东区瑞庆路 528 号 15 幢乙号
售后服务单位名称：上海仁度生物科技股份有限公司
邮政编码：201201 电话：021-50720200
传真：021-50720186 网址：www.rdbio.com
生产地址：上海市张江高科技园区东区瑞庆路 528 号 15 幢乙号；
瑞庆路 528 号 10 幢乙号 3 层；瑞庆路 590 号 7 幢 301 室
生产企业许可证编号：沪药监械生产许 20081588 号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

国械注准 20153401875

【说明书核准及修改日期】

批准日期：2021 年 07 月 13 日
修改日期：2022 年 09 月 13 日