

结核分枝杆菌利福平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：结核分枝杆菌利福平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利福平耐药突变的定性检测。

本试剂盒通过检测结核分枝杆菌复合群 *rpoB* 基因 507～533 共 27 个氨基酸密码子区域内（81bp，利福平耐药决定区）的突变进行耐药筛选，以辅助结核临床诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，其基本原理（见图 1、图 2）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倒数，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。

【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	RIF PCR Mix A	引物、探针(1 条 FAM 标记探针, 1 条 TET 标记探针)、dNTP、dUTP Mix	980 μL/管	1 管
	RIF PCR Mix B	引物、探针(1 条 FAM 标记探针, 1 条 TET 标记探针)、dNTP、dUTP Mix	980 μL/管	1 管
	TB 酶混合液	Taq 酶、UNG 酶	42 μL/管	1 管
对照试剂	RIF 阳性对照	含四个野生型扩增靶基因的质粒	40 μL/管	1 管
	TB 阴性对照	不含靶基因的溶液（Tris、EDTA•2H ₂ O 钠、TritonX-100）	40 μL/管	1 管
提取试剂	TB DNA 提取液	Tris、EDTA•2H ₂ O 钠、TritonX-100	14 mL/瓶	1 瓶

【储存条件及有效期】

-18℃以下避光保存，有效期为 12 个月。

试剂盒内各组分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、蜡纸盒收集痰液样品。痰容器应标明病人姓名、编号（初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品。患者留取的痰液样品，应由检验人员或经培训的专人目视检查样品质量：样品量一般在 3～5 mL，样品形状属于干酪痰、褐色血痰或含少量新鲜血液的血痰、粘液痰者为合格的样品；痰液样品不合格者，如唾液样品，应在进一步指导后重新送检。

② 样品制备

NaOH 法：将痰液样品加到 50 mL 带螺旋盖子的试管中。视样品性状，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。

③ 分离培养

用无菌滴管吸取消化后的痰液约 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 和 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。

④ 菌种鉴定

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 1 mg/mL 菌悬液。取 1 mg/mL 菌悬液用 0.5% 吐温-80 生理盐水逐步稀释至 10⁻² mg/mL 菌悬液，取 0.1 mL 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 10⁻³ mg。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。MTB 复合群在 PNB 培养基上不生长。

⑤ 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 22 SWG 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：冻存结核分枝杆菌复合群菌株的固体培养物

直接取菌保存液 0.1 mL 接种至中性改良罗氏培养基斜

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。

取复苏培养 2~3 周的培养物，用 22 SWG 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。

3：新鲜痰液样品的液体培养物

① 样品采集

同【样品要求】中“1：新鲜痰液样品的固体培养物”的“样品采集”。

② 样品制备

NaOH 法：将痰液样品加到 50 mL 带螺旋盖子的试管中。视样品性状，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，使痰液充分液化，室温放置于生物安全柜内，约 15~20 分钟；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。

③ 分离培养

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 15 mL OADC 将 PANTA 溶解，用移液器在每个 MGIT 管内添加溶解后的 0.8 mL 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，以最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。

④ 菌种鉴定

PNB 生长试验：取 1~2 mL 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 1 mg/mL 菌悬液。取 1 mg/mL 菌悬液用 0.5% 吐温-80 生理盐水逐步稀释至 10⁻² mg/mL 菌悬液，取 0.1 mL 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 10⁻³ mg。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。MTB 复合群在 PNB 培养基上不生长。

⑤ 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，14000 g 离心 15 分钟，丢弃上清并在 250 μL TB DNA 提取液中重悬细菌。

4：冻存结核分枝杆菌复合群菌株的液体培养物

使用 BACTEC™ MGIT™ 960 全自动分枝杆菌培养仪。直接取 0.1 mL 菌液加入到 MGIT 管中，盖紧管盖并混匀。按照培养仪的具体操作步骤，放置到培养仪器相应的位置进行孵育，等待仪器自动报告结果。

复苏培养 2~3 周的培养物取 1 mL，10000 g 离心 15 分钟，丢弃上清并在 250 μL TB DNA 提取液中重悬细菌。

【检验方法】

1：试剂准备——配液区

- 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 RIF PCR Mix A 和 n×0.4 μL TB 酶混合液加入到 1.5 mL 离心管中，振荡混匀数秒，3000 g 离心数秒；另取 n×19.6 μL RIF PCR Mix B 和 n×0.4 μL TB 酶混合液加入到另一 1.5 mL 离心管中，振荡混匀数秒，3000 g 离心数秒。配好的 PCR 反应液必须贮存于-18℃ 以下并在 4 小时内使用。
- 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。
- 将配制好的 PCR 反应管装入凹口袋转移至提取间。贮存在-18℃ 以下直至样品提取处理完毕。

2：样品提取及加样——提取区

- 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 1 mL，10000 g 离心 15 分钟，丢弃上清并在 250 μL TB DNA 提取液中重悬细菌。
- 封口膜封口，99℃ 加热 20 分钟。14000 g 离心 10 分钟，转移上清到新 1.5 mL 离心管。上清即为 PCR 扩增模板。（模板可保存于-18℃ 以下，并于 1 个月内完成试验。注意不要反复冻融样品。）
- 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 μ L		
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℃ 15 秒	13
		70℃ 20 秒(每个循环下降 1℃)	
		76℃ 25 秒	
	PCR 循环程序	95℃ 15 秒	42
		57℃ 20 秒	
76℃ 25 秒			
熔解分析程序		95℃ 2 分钟	1
		40℃ 2 分钟	
		45℃-85℃, 设置在此阶段每 1℃	
		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）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

【参考值（参考范围）】

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℃ $\pm$ 1℃；TET 通道 74℃ $\pm$ 1℃。
反应体系 B 中 FAM 通道 65℃ $\pm$ 1℃；TET 通道 67℃ $\pm$ 1℃。

本说明书中各 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，试验菌株对利福平敏感；四个通道任一通道中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，试验菌株对利福平耐药。

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出现双峰时，即为杂合样品，如图 3；②为一个融合峰，与阳性对照的熔点一致，但峰型跟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 4；③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 5。杂合样品对利福平耐药，建议出现杂合样品时将样品重复检测，以确定样品耐药性。

特殊突变：533 位点 CTG>CCG（反应体系 B TET 通道）突变会导致熔解曲线无明显突变峰，曲线位于 0 线上下，不同

于野生型峰、突变型峰及阴性对照，如图 6。此种类型突变的相关菌株仍有可能对利福平敏感，目前文献中尚无定论。

阴性对照结果判读意义：阴性对照加入的是没有模板的 TB DNA 提取液，可以质控提取过程中是否发生了提取的污染和空气中气溶胶的污染。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。

无熔解峰出现的原因和判读：①若出现两个或两个以上通道无熔解峰的情况，说明该样品无有效信号。出现这种情况有几种可能的原因：样品中不含结核分枝杆菌或结核分枝杆菌含量较低；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；实验操作失误；试剂盒失效。②特殊突变会导致反应体系 B 的 TET 通道没有熔解峰，这种类型的突变仪器采集到的是探针与模板杂交后产生的荧光，与阴性对照的熔解曲线不同可以进行区分。

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. 由于本试验只筛选核酸序列而不是氨基酸序列，因此，有可能不引起氨基酸改变的突变（沉默突变）也会被判为突变型。
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 *rpoB* 基因利福平耐药决定区引起的耐药，由其他基因或基因区引起的突变以及其他利福平耐药机制引起的耐药本试验不能检测。
5. 若不均一耐药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，试验菌株判定为对利福平敏感，造成假阴性结果。
6. 鉴于现有文献和研究资料无法证明，81bp 的被测物中每个碱基的突变均能导致利福平耐药，而方法学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。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒可对 *rpoB* 基因与利福平耐药相关的 81bp 进行突变检测。
2. 野生型检测限为 2×10^4 菌/mL，突变型检测限为 2×10^4 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 1048 例固体培养基培养的样品，研究表明，与药敏试验结果相比较，本产品的临床灵敏度（真阳性率）为 95.80%，临床特异性（真阴性率）为 95.95%。
6. 本产品进行的临床试验共验证 214 例液体培养基培养的样品，研究表明，与药敏试验结果相比较，本产品的临床灵敏度（真阳性率）为 97.5%，临床特异性（真阴性率）为 97.7%。

【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。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。
5. PCR 反应混合液应避免保存。
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。

【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：400-661-8810/0592-7615088

售后服务单位名称：厦门致善生物科技股份有限公司

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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173400497

【说明书核准日期及修改日期】

2020年07月27日

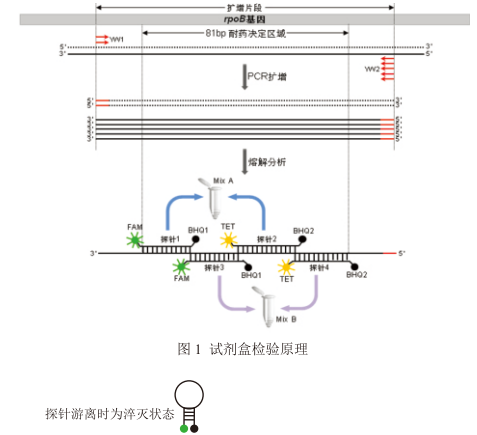


图1 试剂盒检验原理

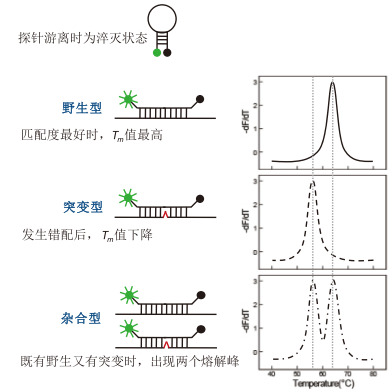


图2 荧光 PCR 熔解曲线法基本原理

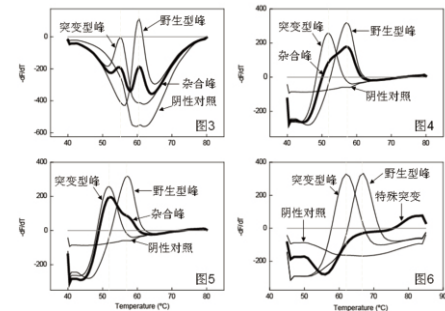


图3

图4

图5

图6