

结核分枝杆菌和利福平耐药突变检测试剂盒

（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌和利福平耐药突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 测试/盒、48 测试/盒、96 测试/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复合群核酸以及结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本中的利福平耐药相关的 *rpoB* 基因突变。本产品无法明确具体突变类型。

本产品用于对疑似结核病患者以及利福平耐药的耐药结核病的辅助诊断。

结核病是由结核分枝杆菌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所引发的侵害人类多器官系统的传染病。WHO 在 2020 年报告全球约 1/4 人口感染结核杆菌，2019 年约有 996 万新发结核病病例，其中因结核病或并发症死亡 140 万。

耐药结核病是指致病的结核分枝杆菌对抗结核药物产生抵抗性。肺结核的治疗原则之一是多药联用，常见的抗结核治疗一线药物包括：利福平（RIF）、异烟肼（INH）、乙胺丁醇（EMB）、吡嗪酰胺（PZA）。然而结核分枝杆菌有可能对一种或多种药物产生耐药性，使治疗更加困难。

耐药结核病是公共卫生重大威胁。2019 年，全球有近 50 万人罹患利福平耐药结核病（RR-TB），其中 78% 患有耐多药结核病（MDR-TB）。与其他抗结核药物相比，利福平单耐药发生的概率较低，但利福平耐药可作为耐多药结核的指征（耐多药结核病是指致病结核杆菌至少对异烟肼和利福平两种药物耐药）。

本产品选用 IS6110 作为结核分枝杆菌复合群核酸的检测靶点，该序列在大多数结核分枝杆菌分离株中拷贝数较高，且只存在于结核分枝杆菌复合群中，是分子生物学方法检测结核分枝杆菌的首选靶点。本产品选用 *rpoB* 基因作为利福平耐药突变的检测靶点，能检测 *rpoB* 基因 513、516、522、526、531、533 等常见突变位点的点突变引起的利福平耐药，亦能检测 *rpoB* 基因 510/511/512、517/518 等常见突变位点的缺失突变引起的利福平耐药。

本产品适用人群：具有肺结核相关体征/症状或 X 线检查结果的疑似结核病患者或结核病患者。

本产品实验操作人员应接受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，实验室应具备相应的生物安全防护条件。

本产品为结核分枝杆菌复合群以及利福平耐药基因突变检测的双功能试剂，仅在结核分枝杆菌检出的情况下，报告利福平耐药突变检测结果。

本试剂盒检测结果仅用于结核病或利福平耐药结核病的临床辅助诊断，不可作为临床诊断和治疗的唯一依据。

【主要组成成分】

本试剂盒不同规格主要组成成分如下：

名称	包装规格			试剂主要成分
	24 测试/盒	48 测试/盒	96 测试/盒	
PCR 反应管 A	1 包 (24 管/包)	1 包 (48 管/包)	2 包 (48 管/包)	rpoB 引物/探针、内参引物/探针、突变探针 (A、C 和 E)、DNA 聚合酶
PCR 反应管 B	1 包 (24 管/包)	1 包 (48 管/包)	2 包 (48 管/包)	IS6110 引物/探针、rpoB 引物/探针、内参引物/探针、突变探针 (B 和 D)、DNA 聚合酶
阳性质控品	1 包 (1 瓶/包)	1 包 (1 瓶/包)	1 包 (1 瓶/包)	含有结核分枝杆菌阳性质粒冻干粉
阴性质控品	10mL/瓶 ×1	10mL/瓶 ×1	10mL/瓶×1	DEPC 水
内参	10mL/瓶×1	10mL/瓶×1	20mL/瓶×1	灭活的枯草芽孢杆菌

本试剂盒须配套使用苏州创澜生物科技有限公司的核酸提取试剂盒（磁珠法）（苏苏械备 20190272 号）进行样品核酸提取纯化。

【检验原理】

本试剂盒使用荧光定量PCR技术，对人痰液样本中结核分枝杆菌复合群核酸以及利福平耐药突变进行定性检测。其原理如下：

- 1) 本产品针对结核分枝杆菌特异性区域 IS6110 设计引物探针，用于检测结核分枝杆菌复合群核酸；
- 2) 本产品针对 rpoB 基因 81bp 利福平耐药决定区 (RRDR) 设计引物/探针，其中 1 条探针位于保守区，5 条探针位于突变高发区，当 rpoB 基因发生突变时，突变高发区的探针与检测靶点的结合力下降，导致该探针扩增曲线的 Ct 值延后，从而与保守区探针的 ΔCt 增大，当 ΔCt 大于阈值时，认为检测到 rpoB 基因上的利福平耐药突变。

【储存条件及有效期】

试剂盒应于 2~25℃保存，有效期为 12 个月；

试剂盒开封后应于 2~8℃保存，开封后保存时间不超过 2 周；

试剂盒应于 -15~30℃条件下运输，运输时间不超过 7 天；

生产日期，使用期限或者失效日期：见标签。

【样本要求】

1) 样本的收集:

每份样品需要收集至少 1mL 痰液, 在采集痰液样本时样本提供者需坐好或站好。正确的收集痰液的方法:

- a) 患者应先用清水漱口 2 次;
- b) 打开痰样本收集容器的螺旋盖;
- c) 请患者深吸气, 然后用力呼出, 从肺部深处咳出痰, 收集于样本容器中。注意将开盖的样本容器靠近嘴边收集痰液, 避免溅到容器盒外;
- d) 拧紧容器盒盖, 采集好的痰样应尽快送检。

注: 禁止使用含有明显食物颗粒或其他固体颗粒的样本。

2) 样本的运送和保存:

样本采集后应及时送检; 样本采集后如不能及时进行检测, 应按如下条件保存:

- a) 室温条件下保存 8h 对检测结果无影响;
- b) 2~8°C条件下保存, 保存期为 7 天;
- c) -25~-15°C条件下保存, 保存期为 6 个月;
- d) $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 条件下保存, 保存期为 2 年。

【适用仪器】

适用于上海宏石医疗科技有限公司的 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统(国械注准 20183401659)。

【检验方法】

1. 检测准备

首次使用时, 用 5mL 阴性质控品溶解阳性质控品, 未使用完的阴性质控品/阳性质控品置于 2~8°C保存。

2. 检测流程

2.1 超声破碎

- 1) 将 1mL 待测样本(或阴/阳性质控品)加入 6mL 裂解液中, 再向混合液中加入 150 μL 内参, 盖紧盖子, 混合均匀;
- 2) 打开样本超声仪电源开关;
- 3) 保持样本容器正立, 放置在样本超声仪的超声探头中心位置, 按下固定装置开关, 仪器自动将样品容器固定在超声探头上;
- 4) 检查无误后, 点击“开始”, 进行样品超声处理。

2.2 核酸提取

将超声后的产物放入配套核酸提取仪器中, 并在相应的位置方式提取所需的耗材和试剂。

剂，具体操作参见配套核酸提取试剂说明书。

检查无误后，选择程序“MTB-RIF”进行核酸提取，提取的核酸溶解于 400μL 洗脱液中。

2.3 PCR 反应体系配制

1) 打开 PCR 反应管的真空铝箔袋包装，根据待测样本的数量 (n)，取出 n+2*的反应管 A 和反应管 B，放置在 PCR 管架上，打开管盖。

***注意：**每次 PCR 检测需有阴性质控品和阳性质控品作为对照，故需要的 PCR 试剂数量为 n+2。

2) 从样本提取得到的核酸洗脱液中，分别吸取 25μL 加入到反应管 A 和反应管 B 中，使冻干产物完全复溶后进行 PCR 检测。

2.4 PCR 检测

1) PCR 使用宏石全自动医用 PCR 分析系统，实验类型选择“定性/绝对定量”，热盖设置勾选“使用热盖”，通道扫描设置选择“仅扫描项目所选通道”，控温方式选择“模块控温”。通道、激发-发射波长 (nm)、适用探针/染料和荧光通道颜色按照如下表进行设置 (每个样品一次检测均进行反应管 A 和反应管 B 两个反应管的 PCR 检测，试管排列方式选择“横排”，常用选项-扩增曲线选择“绝对荧光”。)。

通道	1	2	3	4	5
适用探针/染料	FAM	VIC/JOE	ROX	CY5	Quasar705
反应管 A	Probe-A	Probe-C	Probe-E	rpoB-1	IPC-1
反应管 B	TB-DNA	Probe-B	Probe-D	rpoB-2	IPC-2

2) PCR 反应程序按照下表进行设置，反应体积 (Sample Volume) 为 25。

步骤		温度	时间	Cycle
1	静置 (可选)	50°C	2 分钟	1
2	Taq 酶活化，预变性	95°C	3 分钟	1
3	变性	95°C	25 秒	5
4	退火	58°C	30 秒	
5	延伸	72°C	30 秒	
6	变性	95°C	25 秒	40
7	退火	55°C	30 秒(收集荧光)	
8	延伸	72°C	30 秒	
9	仪器冷却 (可选)	25°C	10 秒	1

3) PCR 扩增曲线阈值设置

内参 (IPC-1/ IPC -2) 设置“手动阈值” 2；其他探针设置“手动阈值” 50。

4) PCR 结果采用自动判读插件进行自动判读 (插件号：MTB-RIF 8.2.2.220121)

【检验结果的解释】

按照如下步骤进行检测结果判读：

1. 检测结果的质控要求

1) 内参的检测结果要求

- a) 反应管 A 中第 1~4 通道的均为 NoCt 时，第 5 通道（Quasar705）的 $Ct \leq 35$ ；
反应管 B 中第 1 通道（FAM）的 Ct 值 > 31.98 且 2~4 通道的均为 NoCt 时，第 5 通道（Quasar705）的 $Ct \leq 35$ 。
- b) 出现其它检测结果时，对内参不做要求。

注意：每份检测样本（含阴阳性质控品）的内参检测结果均应符合“内参质控要求”。如样本内参检测结果不合格，则应使用剩余样本重新进行检测。

2) 阴阳性质控品的检测结果要求

阴阳性质控品同待测样本一起，全程参与超声、提取和 PCR 的整个检测过程：

- a) 阴性质控品的检测结果应为结核分枝杆菌“未检出”，且其它检测靶标均无扩增曲线；
b) 阳性质控品的检测结果应为结核分枝杆菌“检出”，且其它检测靶标均有典型性扩增曲线。

注意：阴阳性质控品的要求需一次实验中同时满足，否则视为实验无效。如果阴阳性检测结果预期结果不符，建议采用未开封试剂重新进行检测。

2. 结核分枝杆菌检测结果

内参检测结果“合格”后，按照如下标准进行结核分枝杆菌核酸检测结果判读：

反应管 B 中 FAM 通道 Ct 值	结核分枝杆菌检测结果
$Ct \leq 31.98$	检出
$Ct > 31.98$	未检出

3. 利福平耐药突变检测结果

在结核分枝杆菌检测结果为“检出”的情况下，按照如下标准进行结核分枝杆菌利福平耐药突变检测结果判读（计算 ΔCt 时， Ct 值为“NoCt”的以“40”计。）：

- a) **利福平耐药：**满足下列任一条件判断为结核分枝杆菌利福平耐药。

i	$\Delta Ct A = Ct \text{ 值 (Probe-A)} - Ct \text{ 值 (rpoB-1)} \geq 2.09$
ii	$\Delta Ct B = Ct \text{ 值 (Probe-B)} - Ct \text{ 值 (rpoB-2)} \geq 2.00$
iii	$\Delta Ct C = Ct \text{ 值 (Probe-C)} - Ct \text{ 值 (rpoB-1)} \geq 2.93$
iv	$\Delta Ct D = Ct \text{ 值 (Probe-D)} - Ct \text{ 值 (rpoB-2)} \geq 3.81$
v	$\Delta Ct E = Ct \text{ 值 (Probe-E)} - Ct \text{ 值 (rpoB-1)} \geq 3.15$

- b) **利福平敏感：**同时满足下列所有条件判断为结核分枝杆菌利福平敏感：

i	$\Delta Ct A = Ct \text{ 值 (Probe-A)} - Ct \text{ 值 (rpoB-1)} < 2.09$
ii	$\Delta Ct B = Ct \text{ 值 (Probe-B)} - Ct \text{ 值 (rpoB-2)} < 2.00$

iii	$\Delta Ct C = Ct \text{ 值 (Probe-C)} - Ct \text{ 值 (rpoB-1)} < 2.93$
iv	$\Delta Ct D = Ct \text{ 值 (Probe-D)} - Ct \text{ 值 (rpoB-2)} < 3.81$
v	$\Delta Ct E = Ct \text{ 值 (Probe-E)} - Ct \text{ 值 (rpoB-1)} < 3.15$

4. 检验结果的解释

本试剂盒为可同时进行“结核分枝杆菌复合群核酸检测”以及“利福平耐药基因突变检测”的双功能试剂，具体检验结果的解释如下：

检测结果		检验结果解释	备注
结核分枝杆菌	利福平耐药突变		
未检出	\	未检测到结核分枝杆菌复合群的目标DNA，结核分枝杆菌阴性	仅在结核分枝杆菌检测结果为“检出”的情况下，报告“利福平耐药突变”检测结果。
检出	敏感	检测到结核分枝杆菌复合群的目标DNA，结核分枝杆菌复合群阳性；但未检测到利福平耐药相关的 rpoB 基因突变，利福平敏感。	
检出	耐药	检测到结核分枝杆菌复合群的目标DNA，结核分枝杆菌复合群阳性；且检测到利福平耐药相关的 rpoB 基因突变，利福平耐药。	

【注意事项】

- 1) 实验前请仔细阅读说明书，并严格参照说明书要求进行实验；
- 2) 检测血液、脑脊液、尿液等样本中的结核分枝杆菌复合群性能尚未得到证实；本说明书以外的样本采集处理方式和核酸提取方法性能尚未得到评估；
- 3) 检测用完的样品采集处理装置，核酸提取纯化过程中使用的耗材，均应视为传染源。由于传染性的不确定性，因此对所有生物样本均应按照相关要求进行处理。
- 4) 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》(卫办医政发(2010)194号，或现行有效版本)等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

【参考文献】

- 【1】 WHO Global Tuberculosis report2018.
- 【2】 Anti-Tuberculosis resistance in the world:forth global report. WHO/HTM/TB/2008.394.
- 【3】 Ashok Rattan, Awdhesh Kalia, and Nishat Ahmad, Multidrug-Resistant Mycobacterium Tuberculosis: Molecular Perspectives, Emerging Infection Diseases, Vol.4 No.2.
- 【4】 Molecular Line Probe Assays for rapid screening of patients at risk of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB).

- 【5】 Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW(eds)(1993).HHS Publication number(CDC)93-8395.
- 【6】 Benjamin A. Pinsky, Niaz Banaei. Multiplex Real-Time PCR Assay for Rapid Identification of Mycobacterium tuberculosis Complex Members to the Species Level. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 446:2241-2246.
- 【7】 肺结核诊断和治疗指南（2013）.
- 【8】 《肺结核诊断标准》WS 288-2017.
- 【9】 肺结核基层诊疗指南（2018）.
- 【10】 中国耐多药和利福平耐药结核病治疗专家共识（2019 年版）.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州创澜生物科技有限公司

住所：苏州工业园区桑田街 218 号生物产业园 2 号楼 301 单元

联系方式：0512-62626097

售后服务单位：苏州创澜生物科技有限公司

联系方式：0512-62626097

生产地址：苏州工业园区桑田街 218 号生物产业园 2 号楼 301 单元，苏州工业园区桑田街 218 号生物产业园 1 号楼 B101 单元

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】