



【产品名称】

通用名称: 分枝杆菌核酸检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

20 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测临床痰样本中提取出来的分枝杆菌核酸。

本试剂盒适用于临床疑似结核病和非结核分枝杆菌病的患者,用于临床结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌感染的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用双重 PCR 技术和 Taqman 探针技术相结合,对从临床痰样品中提取的分枝杆菌核酸进行定性检测。分别针对结核分枝杆菌复合群和分枝杆菌的特异性序列设计引物和探针,两个探针分别标记不同的荧光发光基团。检测时,当反应体系中有目的基因存在时,随着 PCR 反应的进行,就会释放出荧光。通过监测不同荧光通道的荧光信号变化,进而实现对结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌的检测。

【主要组成成分】

表 1 试剂盒组成

组分名称	规格	主要成分	数量
洗液	20 mL/瓶	10 mM EDTA	1
核酸提取液	1.1 mL/管	1×TE	1
核酸提取管	20 管/袋	玻璃珠	1
扩增反应液	18 μL×20 管/袋	引物、探针、酶	1
阳性对照品	400 μL/管	含目的核酸克隆片断的克隆菌	1
阴性对照品	400 μL/管	1×TE	1

注:不同批号的试剂不可混用。

【储存条件及有效期】

-20℃避光储存,有效期 8 个月。

生产日期和失效日期见产品标签。

【适用仪器】

适用于 ABI 7700、ABI 7500 荧光 PCR 检测系统,杭州博日科技有限公司 FQD-96A 荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 检测系统, Eppendorf 公司 Mastercycler ep realplex 4 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

● 采集

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液于无菌样本保存管中,密封,即可送检,痰量 1~5 mL 为宜。样本性状属于干酪痰、褐色血痰或含少量新鲜血液 (不超过 5%) 的血痰、粘液痰者为合格的样本。

● 存放

待测样本在 2~8℃保存不应超过 72 小时。

● 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 (标本制备区)

1.1 加入和痰等量的 4%NaOH 溶液 (用户自行准备), 震荡混匀后, 室温放置 30 分钟 (对于痰液较浓的样品可适当延长时间)。

1.2 取 1 mL 液化后液体装入 1.5 mL 无菌离心管中, 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 弃上清。

1.3 加入 1 mL 洗液, 充分涡旋后 12000 转/分钟, 离心 5 分钟, 弃上清。

1.4 加入 50 μL 核酸提取液, 充分涡旋后转入核酸提取管中, 放入核酸提取仪 (Extractor 36), 最大转速振荡 5 分钟。

1.5 95℃水浴锅中放置 5 分钟, 5000 转/分钟 离心 1 分钟, 备用, 在 -20℃

±5℃条件下可保存 1 个月。

2. 阴性对照品的准备 (标本制备区)

取 50 μL 阴性对照品于核酸提取管中, 放入核酸提取仪, 最大转速振荡 5 分钟, 95℃水浴锅中放置 5 分钟, 5000 转/分钟 离心 1 分钟, 放置 -20℃保存备用。

3. 阳性对照品的准备 (标本制备区)

取 50 μL 阳性对照品于核酸提取管中, 放入核酸提取仪, 最大转速振荡 5 分钟, 95℃水浴锅中放置 5 分钟, 5000 转/分钟 离心 1 分钟, 放置 -20℃保存备用。

4. 扩增试剂准备 (扩增反应混合物配制区)

● 取出扩增反应液, 置于冰盒上, 解冻, 每个样本取 2 μL (请尽量吸取上层液体), 加入扩增反应液管中。

● 每次检测应设阴性和阳性对照。阴、阳对照品加入量均为 2 μL。

5. PCR 扩增 (扩增区)

PCR 扩增程序

温度 (℃)	37	94	94	60	50
时间 (s)	300	180	15	30	10
循环数	1	1	40		1

6. 检测通道设定

同时选择 FAM 和 HEX (或 VIC) 通道, 荧光采集点选择 60℃ 30s。

7. 分析条件的设定

用户根据分析后图像自行调整基线 (baseline) 和阈值线 (threshold)。基线 (baseline) 一般取 2~15 个循环的荧光信号, 也可根据实际情况进行调整, 阈值线 (threshold) 根据仪器的实际噪声情况进行调整。

8. 质量控制

➢ 正常阴性对照品, 无 S 型扩增曲线, 或 Ct 为 40 或无任何数值 (视仪器而定)。

➢ 正常阳性对照品, 扩增呈 S 型曲线, 且 Ct 值小于 40。

以上两个条件应同时满足, 否则, 此次实验视为无效。

【阳性判断值】

本试剂盒的参考值为 40, 样本扩增曲线呈 S 型, 且 Ct 值小于 40 判定为阳性, 扩增曲线不呈 S 型或 Ct 值为 40 (或无任何数值) 判定为阴性。

【检验结果的解释】

检测结果		结果解释
FAM 通道	HEX 通道	
+	+	结核分枝杆菌核酸检测阳性
+	-	结核分枝杆菌核酸检测阳性
-	+	非结核分枝杆菌核酸检测阳性
-	-	分枝杆菌核酸检测阴性

注: 不合理的样本运输/处理均可能影响核酸提取效率或引入扩增抑制物而造成假阴性的结果。

本试剂盒的检测阴性结果并不能完全排除阳性的可能, 而对于检测的阳性结果则需进行进一步确认。

【检验方法的局限性】

● 样本中混合有结核和非结核分枝杆菌时, 仅能报告结核分枝杆菌核酸检测阳性。

● 本试剂盒不能用来区分鉴定非结核分枝杆菌。

● 如果引物、探针设计区段出现新的突变, 可能造成假阴性的结果。

● 本产品未对所有分枝杆菌菌种进行验证, 因此, 当本试剂盒检测结果为分枝杆菌核酸检测阴性时, 并不能排除被检测者带有其他种类的分枝杆菌。

【产品性能指标】

1. 阳性参考品符合率: 对 20 份企业阳性参考品进行检测, P1~P10 均为结核分枝杆菌核酸检测阳性, P11~P20 均为非结核分枝杆菌核酸



检测阳性；对 15 份国家阳性参考品进行检测，均为结核分枝杆菌核酸检测阳性。

2. 阴性参考品符合率：对 10 份企业阴性参考品进行检测，均为分枝杆菌核酸检测阴性；对 15 份国家阴性参考品进行检测，均为结核分枝杆菌核酸检测阴性（非结核分枝杆菌核酸检测阳性或分枝杆菌核酸检测阴性）。
3. 检出限：对企业检出限参考品 S1~S4 进行检测， 5×10^3 个菌/mL（即 10 个菌/PCR 反应）及以上浓度检出限参考品为结核分枝杆菌核酸检测阳性， 5×10^3 个菌/mL 以下浓度检出限参考品可为结核分枝杆菌核酸检测阳性或分枝杆菌核酸检测阴性；对企业检出限参考品 S5~S8 进行检测， 5×10^4 个菌/mL（即 10^2 个菌/PCR 反应）及以上浓度检出限参考品为结核分枝杆菌核酸检测阳性， 5×10^4 个菌/mL 以下浓度检出限参考品可为非结核分枝杆菌核酸检测阳性或分枝杆菌核酸检测阴性。对 4 份最低检出量国家参考品进行检测， 1×10^2 个菌/mL 及以上浓度最低检出量参考品为结核分枝杆菌核酸检测阳性， 1×10^2 个菌/mL 以下浓度最低检出量参考品可为结核分枝杆菌核酸检测阳性或分枝杆菌核酸检测阴性。
4. 重复性：对 2 份重复性企业参考品每一份重复检测 10 次，R1 均为结核分枝杆菌核酸检测阳性，R2 均为非结核分枝杆菌核酸检测阳性，且 Ct 值的变异系数（CV）均不高于 5%。对 10 份重复性（或精密性）国家参考品进行检测，均为结核分枝杆菌核酸检测阳性，且 Ct 值的变异系数（CV）不高于 5%。
5. 采用浓度均为 1 mg/mL 的其他常见呼吸道细菌（白色念珠菌、变形链球菌、表面葡萄球菌、产气肠杆菌、大肠埃氏菌、肺炎克雷伯杆菌、粪产碱杆菌、粪肠球菌、弗氏枸橼酸杆菌、干燥棒状杆菌、巴西诺卡氏菌、缓症链球菌、假白喉棒状杆菌、金黄色葡萄球菌、粘质沙雷菌、淋病奈瑟氏菌、化脓链球菌、普通变形杆菌、奇异变形杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、藤黄微球菌、铜绿假单胞菌、豚鼠耳炎诺卡氏菌、唾液链球菌、微黄奈瑟氏菌、星形诺卡氏菌、乙酸钙不动杆菌、阴沟肠杆菌、意大利游动放线菌、紫红红球菌）进行特异性测试，均未出现假阳性结果。
6. 本试剂盒在三家医疗机构进行了临床研究，共 1071 例样本。研究结果显示，细菌学阳性样本检出率为 97.0%；与临床诊断结果相比较，临床灵敏度（阳性符合率）50.3%，临床特异性（阴性符合率）为 98.9%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，请勿使用过期试剂。
2. 操作注意安全防护。操作致病菌 DNA 应在规定的实验场所进行，穿戴防护衣物、一次性手套、口罩；所有直接接触过细菌的物品应严格消毒后销毁或再次使用。
3. 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测实验室的管理规范执行。实验室应严格分区（试剂储存和准备区、标本制备区、扩增反应混合物配置和扩增区等），各区域必须有明确的标记，不同工作区域的设备、物品不得混用。
4. 标本制备区应严格按照《结核病诊断实验室规程》的要求进行准备和管理。
5. 样本的交叉污染、扩增产物的交叉污染均可导致假阳性结果的产生。
6. 不正确的样本收集、保存、运送和处理过程以及样本中含有的扩增抑制物、样本中检测分枝杆菌数量太低，均可导致假阴性检测结果的产生。
7. -20℃保存的核酸样本，应在加样前室温解冻，并作短暂离心后使用。
8. 本试剂盒操作人员必须经过培训后方可上岗。
9. 试剂盒应尽量避免反复冻融。
10. 加入核酸后，应混匀，避免产生气泡。
11. 用户自行准备 4%NaOH。
12. 样本处理中“弃上清”步骤，注意避免吸头吸取沉淀。

【标识的解释】

标签上“**IVD**”标识代表“体外诊断医疗器械”。

【参考文献】

1. 陈效友,王洪平等. TaqMan 聚合酶链反应技术检测结核分枝杆菌 DNA 及其临床应用.中华结核和呼吸杂志; 2000, 23 卷 第 5 期: 284-288.
2. Tanil kocagoz, Engin yilmaz etc. Detection of mycobacterium tuberculosis in sputum samples by polymerase chain reaction using a simplified procedure. Journal of clinical microbiology, 1993, vol.31, No.6:1435-1438.
3. Eiman Mokaddas and Suhail Ahmad. Development evaluation of a multiplex PCR for rapid and differentiation of mycobacterium tuberculosis complex members from Non-Tuberculosis Mycobacteria. Japanese Journal of Infectious Diseases.2007, 60:140-144.
4. Sarman Singh, Krishnamoorthy Gopinath etc. Nontuberculous Mycobacterial infections in Indian AIDS patients detected by a novel set of ESAT-6 polymerase chain reaction primers. Japanese Journal of Infectious Diseases. 2007, 60:14-18.
5. Tobin J.Hellyer, Lucky E DesJardin etc. Specificity of IS6110-Based amplification assays for Mycobacterium tuberculosis complex. Journal of clinical microbiology, 1996, Vol.34, No.11:2843-2846
6. D. DE Wit, L. Steyn etc. Direct detection of Mycobacterium tuberculosis in clinical specimens by DNA amplification. Journal of clinical microbiology, 1990, Vol.28, No.11: 2437-2441.
7. 中国防痨协会基础专业委员会.结核病诊断实验室规程.中国教育文化出版社, 2006 年第一版.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：成都博奥晶芯生物科技有限公司

住所：成都市温江区永宁镇八一路北段 88 号

联系方式：028-67278289

传真：028-67278189

邮编：611135

网址：<http://www.capitalbiotech.com>

售后服务单位名称：北京博奥晶典生物技术有限公司

联系方式：010-69002987

邮箱：techsupport@capitalbiotech.com

网址：<http://www.capitalbiotech.com>

生产地址：成都市温江区永宁镇八一路北段 88 号 3 栋-2 三楼、3 栋-3、3 栋-4（一楼 E-109、二楼、顶楼 3-3 至 3-5）、4 栋（101、103）、5 栋
生产许可证编号：川食药监械生产许 20150041 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20173401341

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2017 年 7 月 28 日

修改日期：

说明书编号：UML—036

版次：1.0