

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装，20 人份/盒；
大包装，48 人份/盒；
单管单人份，20 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人痰液样本、支气管肺泡灌洗液样本中结核分枝杆菌复合群核酸。

结核分枝杆菌复合群（Mycobacterium tuberculosis complex, MTBC）包括结核分枝杆菌（M. tuberculosis）、牛结核分枝杆菌（M. bovis）、非洲分枝杆菌（M. africanum）和田鼠分枝杆菌（M. microti）。其中，结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌和非洲分枝杆菌均可对人致病，产生大致相同的临床表现。结核分枝杆菌可通过呼吸道、消化道或损伤的皮肤侵入易感机体，引起多种组织器官的感染，其中肺结核病占各种类型结核病的 80% 以上，是结核病的主要类型。肺结核常见症状为咳嗽咯痰，痰中带血，其他症状有低烧、夜间盗汗、午后发热、胸痛、疲乏无力、体重减轻、呼吸困难等。结核病是目前世界上由单一传染性病原体引起的重大疾病之一，严重危害人体健康。目前的临床诊断方法主要有结核菌素试验、培养法、酶联免疫法、核酸检测法等。

本试剂盒用于肺结核辅助诊断，检测结果仅供临床参考，不能作为确诊的唯一依据，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以结核分枝杆菌复合群基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行 PCR 扩增，用于结核分枝杆菌复合群的定性检测。另外，本试剂盒带有内标物质，用于对核酸提取、核酸扩增的整个过程进行监控，可减少假阴性结果的出现。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (适用于大包装 20 人份/盒)	MTBC PCR 反应液 A	540μL/管	1	特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	MTBC PCR 反应液 B	60μL/管	1	热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶
	MTBC 内标溶液	120μL/管	1	MTBC 内标菌液
PCR 检测试剂 (适用于大包装 48 人份/盒)	MTBC PCR 反应液 A	1296μL/管	1	特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	MTBC PCR 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶
	MTBC 内标溶液	240μL/管	1	MTBC 内标菌液
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份)	MTBC PCR 反应管 (未贴标签管)	1 人份/管	20	特异性引物和探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶
	MTBC 内标溶液	120μL/管	1	MTBC 内标菌液
质控品 (适用于大包装、单管单人份)	阴性质控品	400μL/管	1	生理盐水
	MTBC 阳性质控品	400μL/管	1	卡介苗

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂（可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂，备案号：粤穗械备 20150320 号、粤穗械备 20181263 号）；4% NaOH 溶液。

质控品说明：MTBC 阳性质控品为灭活卡介苗，使用时需进行核酸提取，应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

【储存条件和有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期为 9 个月。

试剂在 4℃可保存 7 天；试剂在 37℃可保存 72h；避免反复冻融，反复冻融次数不宜超过 7 次；试剂开瓶次数不超过 7 次；运输条件下（运输模拟测试，PCR 扩增试剂在-15℃至-70℃条件下，运输 96 小时，不影响本试剂盒检测性能）96 小时内不影响本试剂盒的检测性能。

试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7500, LightCycler480, DA7600。

【样本要求】

- 适用样本类型：人痰液、人支气管肺泡灌洗液。
- 样本采集：参考《结核病诊断实验室检验规程(中国防痨协会基础专业委员会编著)》或者《临床技术操作规范(结核病分册)(中华医学会编著)》的相关内容。其中：

- (1) 人痰液样本：包括夜间痰、清晨痰和即时痰，检测其中任意一种痰液样本即可。即时痰为患者就诊时咳出的痰液，清晨痰为清晨深咳出的痰液，夜间痰为送痰前一日夜间咳出的痰液。合格痰液应是脓样、干酪样或脓性粘液样性质痰液。使用洁净无菌样本保存容器密封保存。
- (2) 支气管肺泡灌洗液：临床医生按相应操作规程采集。利用支气管镜向支气管肺泡内注入生理盐水并随即吸出至无菌瓶。
3. 样本保存和运送：所采集的样本可立即用于测试，也可于-20±5℃保存 6 个月，样本应避免反复冻融。样本运送采用 0℃冰壶。

【检验方法】

1 样本处理和核酸提取（样本处理区）

1.1 样本前处理

- (1) 痰液中加入 4 倍体积的 4% NaOH，摇匀，室温下放置 30 分钟左右液化；取 0.5mL 至 1.5mL 离心管中，再加入 0.5mL 4% NaOH 室温放置 10 分钟，使其充分液化（无明显固状物并且吸出时无脱丝现象即为液化完全）。13,000rpm 离心 5 分钟，弃上清，收集下层沉淀待用。
- (2) 取支气管肺泡灌洗液 1mL 至 1.5mL 离心管中，13,000rpm 离心 5 分钟；弃上清，收集下层沉淀待用。

1.2 核酸提取

可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（如备案号：粤穗械备 20150320 号、粤穗械备 20181263 号），请按照核酸提取试剂盒说明书进行操作。本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，若提取试剂盒未说明内标使用方法，请按样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例在样本中加入内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的阴性质控品和 MTBC 阳性质控品均按照提取试剂说明操作参与提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。

2 PCR 试剂准备（试剂准备区）

2.1 大包装规格试剂使用：

从试剂盒中取出 MTBC PCR 反应液 A、MTBC PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+ MTBC 阳性质控品）PCR 反应管，

MTBC 单反应扩增体系配制如下表：

MTBC PCR 反应液 A	MTBC PCR 反应液 B	扩增体系
27μL	3μL	30μL

将各组充分混合后进行短时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 30μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

2.2 单管单人份规格试剂使用：直接使用 MTBC PCR 反应管。

3 加样（样本制备区）

往上述对应的 MTBC 反应管中分别加入提取后的待测样本核酸、阴性质控品核酸、MTBC 阳性质控品核酸 20μL，盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4 PCR 扩增（扩增检测区）

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 ABI 7500 仪器设置

- 4.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknow），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: NONE, Reporter Dye2: VIC , Quencher Dye2: NONE, Passive Reference: NONE。
- 4.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

Stage	Reps	Target(℃)	Running Time	Data Collection
1	1	50	00: 02: 00	
2	1	95	00: 15: 00	
3	40	94	00: 00: 15	
		55	00: 00: 45	√

- 设置完成后，保存文件，运行程序。
- 4.3 LightCycler480 仪器设置
- 4.3.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为 FAM,VIC。
- 4.3.2 设置循环条件：

Program Name	Cycles	Targer(℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 02: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	40	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

4.3.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称、类型，设置完成后，保存文件，运行程序。

4.4 DA7600 仪器设置

4.4.1打开软件后，在设置程序参数界面中，设置扩增程序和温度设置，条件如下：

编号	程序名	循环	目标温度（℃）	恒温时间	读取荧光
1	1	1	50	00: 02: 00	
2	2	1	95	00: 15: 00	
3	3	40	94	00: 00: 15	
			55	00: 00: 45	√
4	4	1	40	00: 00: 20	

4.4.2 点击样本参数界面，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（UNK），并在“样本名称”一栏中设置样本名称；探针染料类型选择：FAM，HEX。

4.4.3 设置完成后，保存文件，运行程序。

5 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果。

6 质量控制

6.1 阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线；VIC 检测通道有扩增曲线。

6.2 MTBC 阳性质控品：FAM 检测通道有扩增曲线，且 CT 值≤32；VIC 检测通道有或无扩增曲线。

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

7 结果判断

7.1 若检测样品的 FAM 检测通道无扩增曲线，且在 VIC 检测通道有扩增曲线，可判样品为结核分枝杆菌复合群阴性；

	FAM 检测通道	VIC 检测通道	结果判定
阴性结果判定	无扩增曲线	有扩增曲线	MTBC 阴性

7.2 若检测样品的 FAM 检测通道有扩增曲线，且 CT 值≤38，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为结核分枝杆菌复合群阳性。

	FAM 检测通道	VIC 检测通道	结果判定
阳性结果判定	CT 值≤38	有或无扩增曲线	MTBC 阳性

7.3 若检测样品的 FAM 检测通道有扩增曲线且 CT 值在 38<CT<40 的样品建议复检，若复检结果 CT 值<40 则可判样品为结核分枝杆菌复合群阳性；若复检结果无扩增曲线，可判样品为结核分枝杆菌复合群阴性。

	FAM 检测通道	VIC 检测通道	结果判定
阳性结果判定	CT 值<40	有或无扩增曲线	MTBC 阳性
阴性结果判定	无扩增曲线	有扩增曲线	MTBC 阴性

【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法确定本试剂盒的结核分枝杆菌复合群 DNA 阳性判断值为 38。

【检验结果的解释】

- 1.每次实验均需检测阴性质控品和阳性质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。
- 2.FAM 检测通道结果为阳性时，由于体系的竞争关系，VIC 检测通道（内标通道）结果可能为阴性。
- 3.内标结果为阴性时，若该检测管的 FAM 检测通道也为阴性，说明体系受抑制或操作失误，试验无效，需对该样品进行复检。

【检测方法的局限性】

- 1.样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关；
- 2.样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；
- 3.病原微生物在流行过程中的基因突变则可能导致假阴性结果；
- 4.由于不同提取方法的原理不同，采用不同核酸提取试剂进行样本处理时核酸提取效率存在一定差异，推荐使用本产品说明书中检验方法所选用的核酸提取试剂，用户可根据需求进行选择确认；
- 5.本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段；
- 6.浓度超出本试剂盒检测范围的样本无法确保检测结果。

【产品性能指标】

试剂盒分析性能结果表明：

- 1.本试剂盒的灵敏度可达 1 个菌/mL。
- 2.阴阳性参考品符合率：5 份阳性参考品符合率为 100%；10 份阴性参考品符合率为 100%。
- 3.国家参考品符合率：15 份阳性参考品符合率为 100%；15 份阴性参考品符合率为 100%；4 份最低检出限参考品均为阳性；10 份精密度参考品（J1~J10），10 次检测结果均为阳性，且 FAM 通道 CT 值的变异系数（CV）≤15%。
- 4.精密度：批内、批间的精密性检测 Ct 值的变异系数（CV）均小于 5%。

5.交叉反应：本试剂盒对与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体如：鸟分枝杆菌、土地分枝杆菌、施氏分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、亚洲分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、戈登分枝杆菌、龟胺分枝杆菌、偶然分枝杆菌、草分枝杆菌、巴西诺卡氏菌、北京棒杆菌、肺炎球菌、嗜肺军团菌、百日咳博德特氏菌，在浓度均为 1×10^4 个菌/mL 时检测结果均为阴性，均无交叉反应；人流感病毒（A 型和 B 型）、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、隐球菌、诺卡氏菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、白色念珠菌、人类副流感病毒 I 型、人类副流感病毒 II 型、人类副流感病毒 III 型，在浓度均为 1×10^5 copies/mL 时检测结果均为阴性，均无交叉反应。

6.干扰反应：样本中可能存在的胆红素（0.1 mg/mL）、血红蛋白（200mg/mL）、甘油三酯（2.26mmol/L）、黏蛋白（200mg/dL）以及治疗药物异烟肼（5mg/L）、乙胺丁醇（3μg/mL）、利福平（11mg/L）、吡嗪酰胺（50mg/L）、卡那霉素（20μg/mL）、链霉素（50μg/mL）、氨硫脲（2mg/L）、阿米卡星（38μg/mL）、左氧氟沙星（3.06mg/L）均不干扰本试剂盒检测结果。

【注意事项】

- 1.本产品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书；
- 2.为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：包括卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》；
- 3.产物处理：PCR 结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃；
- 4.全程应避免 DNA 酶污染，实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道；
- 5.使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头；
- 6.PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融；
- 7.如果在样本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性；
- 8.实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增检测区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用；
- 9.实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20-30 分钟；
- 10.完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 待用；
- 11.须对每次实验进行质量控制。

【参考文献】

- 1.Sethi S, Yadav R, Mewara A, Dhatwalia SK, Sharma M, Gupta D. Evaluation of in-house mpt64 real-time PCR for rapid detection of Mycobacterium tuberculosis in pulmonary and extra-pulmonary specimens. Braz J Infect Dis. 2012 Sep 11. pii: S1413-8670(12)00124-9. doi: 10.1016/j.bjid.2012.08.010.
- 2.Hida Y, Hisada K, Shimada A, Yamashita M, Kimura H, Yoshida H, Iwasaki H, Iwano M. Rapid Diagnosis of Tuberculosis by using quenching probe PCR (geneCube). J Clin Microbiol. 2012 Aug 29.
- 3.Velayati AA, Farnia P, Masjedi MR. Recurrence after treatment success in pulmonary multidrug-resistant tuberculosis: predication by continual PCR positivity. Int J Clin Exp Med. 2012;5(3):271-2. Epub 2012 Jun 25.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820

电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

售后和服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820

电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；

广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 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】