

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌复合群核酸。

结核分枝杆菌复合群（M.tuberculosis-complex，MTC）共有五个成员：人型结核分枝杆菌、牛型结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌和卡介苗（BCG，减毒牛分枝杆菌）。前三种为结核病的常见病原菌，可通过呼吸道、消化道和破损的皮肤粘膜进入机体，侵犯多种组织器官，引起相应器官的结核病，以肺结核最常见。其致病作用可能是细菌在组织细胞内顽强增殖引起炎症反应，以及诱导机体产生迟发型变态反应性损伤有关。靶基因序列是结核分枝杆菌复合群中的 H37Rv 基因的一段插入序列。该插入序列含有 1361bp 的核苷酸和 28bp 的反向末端重复序列，属于插入序列 IS3 家族，并且只存在于结核分枝杆菌复合群中，非结核分枝杆菌中并不存在。插入序列的拷贝数约有 10-25 个，PCR 敏感性较高，所以选择该序列作为扩增靶序列。选取该插入序列 90bp 的序列，按照荧光 PCR 引物探针设计原则设计引物探针。本试剂盒对具有结核病相关体征/症状和 X 线检查结果的疑似结核病患者痰液中结核分枝杆菌复合群（MTC）的特异性 DNA 核酸片段进行定性检测，可用于临床对结核分枝杆菌感染的辅助诊断。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，实验室应具备相关的生物安全防备设施及防护程序。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 技术，选取结核分枝杆菌基因组中相对保守的区域，设计特异性引物及探针，在样本核酸提取之后采用荧光 PCR 方法，对临床样本中结核分枝杆菌进行快速定性检测。

本产品采用裂解法提取结核分枝杆菌 DNA 模板，然后在 Taq 酶的作用下对靶区域进行扩增，同时利用 Taqman 荧光探针技术实时监测扩增产物的累积。同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

【主要组成成分】

序号	组分	主要成分
1	裂解液	聚苯乙烯二乙烯基苯螯合树脂、蛋白酶 K
2	TB PCR 反应液	尿嘧啶-N- 糖基化酶、TaqDNA 聚合酶、脱氧核糖核甘三磷酸、氯化镁、两对引物、两条荧光探针
3	TB 阳性质控品	TB 阳性质粒片段
4	TB 弱阳性质控品	TB 阳性质粒片段
5	TB 阴性质控品	灭菌水
6	内标模板	内标阳性质粒的溶液

注 1：不同批次产品之间同一组分不可以相互替换。

注 2：试剂盒以外必需的设备及材料：荧光定量 PCR 仪、涡旋振荡器、生物安全柜、移液器及带滤芯吸头(灭菌)、1.5mL 离心管(灭菌)、离心机、PCR 反应管(荧光 PCR 专用)、无粉乳胶手套。

注 3：试剂盒以外需自备痰液溶解的试剂：4%NaOH 溶液，生理盐水；使用方法见【样本要求】和【检验方法】。

注 4：内标模板与靶基因无同源性。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃ 保存（PCR 反应液需避光保存），有效期 8 个月。开盖后请于 2 个月内使用。试剂盒冻融 3 次内，试剂盒性能稳定不影响使用。采用运输箱内冰袋和干冰密封（-40℃~4℃）运输 7 天，产品可稳定保存至效期末。生产日期和使用期限见包装标签。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500、Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

痰液：采用 WHO 推荐的国际通用螺旋盖痰瓶，或可密封塑料盒、蜡纸盒收集痰样本，痰容器应标明病人姓名、日期、编号；痰标本性状：干酪痰、血痰、粘液痰为合格样本；唾液或口水为不合格样本；初诊病人应收集 3 份痰样本，治疗中或复诊随访病人按期每次收集 2 份痰样本；对当日不能进行涂片检查的痰样本，须置于 4℃冰箱保存，注意防止痰液干涸或污染；样本在 2~8℃条件下可保存 7 天，低于-20℃可长期保存。样本运输采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封运输。检测前请按下述操作进行：将 4% NaOH(自备)按 1：1 比例加入痰液中，37℃作用 30 分钟使其充分液化(无明显固状物，吸出时没有拖丝现象，如液化不完全，可适当增加 NaOH 或延长反应时间)。

【检验方法】

1.实验室分区

实验室应分为试剂准备区、样本制备区、扩增区和产物分析区四个区域，应设置压强差使空气由试剂准备区流向产物分析区方向，严禁人员和物品逆行。

2.核酸提取

2.1 痰液样本核酸的提取

- 1) 取出试剂盒中裂解液，恢复至室温。
- 2) 取 1mL 样品至 1.5mL 离心管中，13,000rpm 离心 5 分钟，去上清。
- 3) 加入 1mL 无菌生理盐水(自备)洗涤，13,000rpm 离心 2 分钟，去上清，再重复洗涤 2 次(最后一步去除上清液，建议用移液枪缓慢吸取，去除上清液)。
- 4) 向沉淀中加入裂解液 50μL(裂解液内有不溶颗粒，取液前充分混匀后使用)，剧烈震荡 5min。
- 5) 95℃干浴或煮沸 10 分钟，13,000rpm 离心 5 分钟，取上清备用。

2.2 质控品

TB 阳性质控品，TB 弱阳性质控品和 TB 阴性质控品无需抽提，使用前室温融化混匀。

3.试剂配制

3.1 配制说明

检测反应必须设置 TB 阳性质控品，TB 弱阳性质控品和 TB 阴性质控品。

3.2 配制过程

提前 30 分钟将试剂取出，室温融化，涡旋振荡 10 秒，2000 rpm 离心 15 秒待用。

确定反应数 N，N=待检样本数(n)+质控品数(3)。计算加到反应混合液中的各个试剂的量，计算如下：

试剂	TB PCR 反应液	内标模板
体积(μL)	19×N	1.0×N

取 1.5 mL 离心管(灭菌)配制反应体系，按上述要求加入组分后，涡旋振荡 10 秒，2000 rpm 离心 15 秒待用。然后将上述混合液 20 μL/管分装至 PCR 反应管（荧光 PCR 专用）中。

4.加样

将已处理样本、TB 阳性质控品、TB 弱阳性质控品和 TB 阴性质控品各 5μL 分别加入 PCR 反应管中，盖紧管盖(避免气泡产生)，2000 rpm 离心 15 秒，将管壁上的液体全部甩至管底，然后立即进行 PCR 扩增反应。

5.PCR 扩增程序设置

5.1 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) 靶基因选择 FAM 通道，内标选择 VIC 通道。
- 3) 循环参数设置见下表：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火、延伸、荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

5.2 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) 靶基因选择 FAM 通道，内标选择 HEX 通道。
- 3) 循环参数设置见下表：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火、延伸、荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

6.结果分析条件设定

6.1 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时，基线(Baseline)的起始点(Start)设定在 5~8 之间，终止点(Stop)设定在 12~15 之间，阈值线(Threshold)通常设定

在 1000~5000 之间(视具体情况而定)。设定之后，点击 “Analyze”（分析）按键，即可从“Report”窗口的 “Ct”处得到各样本的 Ct 值。

6.2 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值，手动调整基线（Non-adaptive baseline）的起始点（Start）一般设定为 5~8，终止点(Stop)一般设定为 12~15，阈值线(Threshold fluorescence)通常设定在 500~2000 之间(视具体情况而定)。设定之后，可以从“Text report”窗口的“Ct(dRn)”处得到各样本的 Ct 值。

7.质量控制

7.1 阴性质控品：靶基因通道无 S 型扩增曲线；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

7.2 阳性质控品：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值<30.0；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

7.3 弱阳性质控品：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 30.0≤Ct 值≤35.0，内标通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

7.4 以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值】

本试剂盒的阳性样本参考值为 Ct 值≤37.0，阴性样本无 Ct 值，37.0<Ct 值≤40.0 为灰度区。

【检验结果的解释】

1.若内标通道没有出现 S 型扩增曲线，则需重复试验，若依旧没有出现 S 型扩增曲线，请联系生产厂家。

2.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道无 S 型扩增曲线，则检测样本为 TB 阴性。

3.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道有 S 型扩增曲线，则有如下解释：

3.1 若靶基因通道 Ct 值≤37.0，则检测样本为 TB 阳性。

3.2 若 37.0<靶基因 Ct 值≤40.0，需重新提取样本核酸进行检测，若重复检测 Ct 值≤40.0，则检测样本为 TB 阳性。

4.若靶基因 Ct 值≤15.0 而又出现不规则曲线，建议重新提取样本核酸或对样本核酸进行一定梯度稀释再进行检测。具体方法见本说明书的样本处理。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 阴性结果仅说明低于本试剂盒的检测限值但不能完全排除 TB 感染的可能，阴性结果建议采用培养药敏方法进一步确认。

3. 以下情况可能造成假阴性

3.1 不合理的样本采集、运送及处理、样本中细菌含量过低均有可能导致假阴性结果。

3.2 待测靶基因的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。

3.3 未经验证的干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。

4. 仅用于体外诊断。

【产品性能指标】

1.本试剂盒最低检出限：10¹ 菌/mL。

2.特异性分析：本试剂与鸟分枝杆菌、亚洲分枝杆菌、草分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、土地分枝杆菌、戈登分枝杆菌、偶发分枝杆菌、龟分枝杆菌、苏加分枝杆菌、海分枝杆菌、次要分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、胃分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、胞内分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、诺卡氏菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、表皮葡萄球菌、白色念珠菌、隐球菌、人类副流感病毒（1、2 和 3 型）、人流感病毒（A 型和 B 型）无交叉反应。

3.抗干扰物质：粘蛋白、血液、人细胞、利福平、异烟肼、链霉素、卡那霉素、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、左氧氟沙星、扎那米韦、羟甲唑啉、氟替卡松对试剂的检测结果没有影响。

4.阳性参考品符合率：国家阳性参考品检测结果均为阳性，符合率为 15/15；企业阳性参考品检测结果均为阳性，符合率为 8/8。

5.阴性参考品符合率：国家阴性参考品检测结果均为阴性，符合率为 15/15；企业阴性参考品检测结果均为阴性，符合率为 8/8。

6.最低检出限：国家最低检出限参考品检测结果 S1~S3 为阳性，S4 未检测出；企业最低检出限参考品重复检测 10 次，阳性符合率为 10/10。

7.精密度参考品：国家精密度参考品重复检测 10 次，阳性符合率 10/10，变异系数 CV%≤5%；2 个浓度的企业精密度参考品重复检测 10 次，阳性符合率为 10/10，变异系数 CV%≤5%。

【注意事项】

1.实验前请仔细阅读本说明书。

2.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。

3.在生物安全柜内进行试剂和标本准备，实验中穿工作服，戴口罩和一次性手套，使用自卸管式移液器。

4.标本制备区内的生物安全柜、超净台、加样器、离心机及其他设备都应使用 10%次氯酸钠溶液消毒，然后用实验室三级水或 70%乙醇洗涤去除残留的次氯酸钠。

5.本试剂盒需-20℃±5℃冷冻保存，试剂使用前要完全解冻，避免反复冻融。

- 6.为使实验室工作区被扩增产物污染的可能性降到最低，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。
- 7.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。对每次实验进行质量控制。移液器必须定期校准。
- 8.标本制备区所用过的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。
- 9.工作完后必须定期对实验室采取有效的去污染措施。
- 10.不同批号试剂盒中各组分不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒，不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断医疗器械
	查阅使用说明

【参考文献】

[1]体外诊断试剂注册管理办法（国家食品药品监督管理总局令第5号）。

[2]国家食品药品监督管理总局关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告（2014年第44号）。

[3]国家食品药品监督管理总局关于发布体外诊断试剂说明书编写指导原则的通告（2014年第17号）。

[4] YY 0466-2003 医疗器械 用于医疗器械标签、标记和提供信息的符号（ISO 15223: 2000, IDT）。

[5] Suresh R P, Jeffrey K A, Jagannath C, *et al.* Identification of viable and non-viable Mycobacterium tuberculosis in mouse organs by directed RT-PCR for antigen 85B mRNA [J]. Microbial Pathogenesis, 2000, 28(6): 335-342.

[6] Shrestha N K, Tuohy M J, Hall G S, *et al.* Detection and differentiation of M. tuberculosis and nontuberculous mycobacterial isolates by real-time PCR [J]. J Clin Microbiol., 2003, 41(11): 5121-5216.

[7] Parashar D, Chauhan DS, Sharma V D, *et al.* Applications of real-time PCR technology to mycobacterial research [J]. Indian J Med Res., 2006, 124(4): 385-398.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路8号

联系电话：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系电话： 010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路8号

生产许可证编号：京食药监械生产许20120027号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20173403274

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2017年07月21日