

【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】 32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人痰液样本中结核分枝杆菌复合群核酸。

结核分枝杆菌复合群可通过呼吸道、消化道或皮肤损伤侵入易感机体，引起多种组织器官的结核病，其中以通过呼吸道引起肺结核为最多。结核分枝杆菌的实验室检查有：1）细菌学检测；2）免疫学检测；3）核酸扩增试验，包括 Q-PCR，TMA 等。本公司开发的试剂盒适用于结核分枝杆菌的辅助诊断，本试剂检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒选用结核分枝杆菌保守基因片段设计特异引物及特异 Taqman 探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合。在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，实现在全封闭反应体系中对结核分枝杆菌核酸的自动化检测。试剂盒中使用内质控体系，能够有效地防止假阴性结果的发生。

本试剂盒设计一段人工合成的非竞争性的序列为内标模板，与结核分枝杆菌的目标基因无干扰，再将这段序列输入 NCBI 网站进行 BLAST 比对分析，证实这段序列在 NCBI 的核酸库中是无法找到的，不会互相干扰，根据该内标模板设计引物探针，HEX 波长检测内标模板，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成份】

组成	主要成分	规格
核酸提取液	Tris、乙二醇四乙酸、氯化钠、氢氧化钠、NP-40、Triton-100、Chelex-100、内标模板	1.8mL×1
结核分枝杆菌复合群反应混合液	Tris-HCl(pH8.9)、氯化钾、氯化镁、dTTP、dATP、dGTP、dCTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq 酶	Taq DNA 酶及抗体	28μL×1
结核分枝杆菌复合群阳性对照	主要成份为结核分枝杆菌基因组 DNA(重组克隆)	100μL×1
阴性对照	主要成份为氯化钠	100μL×1

注：本试剂盒采用煮沸法提取核酸，不同批号试剂盒中各组份不可以互换。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃下保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性；试剂反复冻融三次后，-20℃±5℃下可保存 30 天；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不超过 8 小时；本产品可在 2~8℃下进行运输，运输时间不超过 7 天不会影响产品的稳定性和有效期。

生产日期及失效日期详见标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器为具有 FAM 和 HEX/VIC 荧光通道的 ABI7500 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：痰液。
2. 采集：将患者用力咳出肺深部的痰采集于无菌样本保存管，密闭送检。采集具体方法请参考《临床技术操作规范（结核病分册）》（中华医学会编著）或者《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）。
3. 存放：2~8℃保存，不超过 24 小时；-20℃下保存，不超过 3 个月；-70℃下长期保存，但应避免反复冻融，反复冻融次数不超过 5 次。
4. 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【样本处理区】

- (1) 在待测痰液中加入 4 倍体积的 4%氢氧化钠，混匀，室温下放置 30 分钟至 1 小时使其充分液化；
- (2) 取液化后的样本 0.5mL 于 1.5mL 离心管中加入 0.5mL 4%氢氧化钠后放置 10 分钟，13,000rpm 离心 10 分钟；
- (3) 弃上清，沉淀中加入 1mL 灭菌生理盐水，振荡混匀，13,000rpm 离心 10 分钟，再重复洗涤一次；
- (4) 弃上清，沉淀中加入 50μL 核酸提取液(内含固体沉淀颗粒物，为使颗粒均匀分布，每次取样时请用吸头反复吸打)，振荡混匀 15 秒，100℃水浴或干浴 10 分钟然后 12,000rpm 离心 10 分钟。取上清供 PCR 扩增用，或-20℃储存备用。
- (5) 阴性对照品、阳性对照品直接取出 50μL，加入 50μL 核酸提取液，混匀后 100℃水浴或干浴 10 分钟。12000rpm 离心 10 分钟，备用。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从检测试剂盒中取出结核分枝杆菌复合群反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒。计算所需反应试剂测试数 $n[n=测试数+对照数(2)]$ ，每测试反应体系配制如下：

组分	结核分枝杆菌复合群反应混合液	Taq 酶	总体积
体积	35.2μL	0.8μL	36μL

按 n 测试计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中混匀。按 36μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

单个反应总体积为 40μL，因此往上述分装有 36μL 反应液的 PCR，薄壁管中按顺序分别加入 4μL 结核分枝杆菌复合群阳性对照的处理上清液、4μL 阴性对照的处理上清液以及 4μL 样品的处理上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步骤	循环数	温度(℃)	时间(min: sec)
1	1	95	03:00
2	40	94	00:15
		60	00:30 (收集荧光)

检测荧光选择：检测样本（FAM），内标（HEX/VIC）

【阳性判断值】

结核分枝杆菌复合群阳性判断：FAM 通道检测 Ct 值小于或等于 38.0 时，则判断该样本为结核分枝杆菌复合群阳性。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。阳性对照 FAM 通道的 Ct 值应小于 38，阴性对照的 FAM 通道的 Ct 值无数且内标 HEX/VIC 通道的 Ct 值 < 40；否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

1. 检测样本 FAM 通道的 Ct 值 ≤ 38.0 者判为阳性
2. 检测样本 FAM 通道 38.0 < Ct ≤ 40 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 < 40 者为阳性，否则为阴性
3. 如果检测样本测定 FAM 通道的 Ct 值无数据，需要查看内标 HEX/VIC 通道的 Ct 值，如果内标 Ct 值 < 40 的标本为阴性标本，内标 Ct 值无数据则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

【检验方法的局限性】

1. 本检验方法不能作为临床确诊的依据。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. 实验区域污染、气溶胶污染有可能造成假阳性结果。
3. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
4. 样本中的被检物浓度低于检测限时，有可能造成假阴性的结果。
5. 本试剂盒的适用于使用 ABI7500，天隆 TL988-IV 两种荧光定量检测系统对结核分枝杆菌核酸的检测，其他仪器尚无可靠实验数据，不建议使用。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管及离心管无破损，标签完好。
2. 分析特异性：15 份阴性参考品，检验结果均应为阴性，符合率（-/-）为 15/15。
3. 阳性符合率：15 份阳性参考品，检验结果均应为阳性，符合率（+/+）为 15/15。
4. 检测限：检测限参考品 S1-S4 分别检测 3 次，检测结果应均为阳性。
5. 精密度：用精密度参考品重复测试 10 次，统计 10 次的 Ct 值的变异系数（CV）≤ 5%。
6. 本试剂盒与鸟分枝杆菌、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、龟腺分枝杆菌、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、百日咳博得特氏菌、黄色葡萄球菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、绿脓杆菌、表皮葡萄球菌、白色念珠菌、人类副流感病毒 3 型、鼻病毒、人流感病毒 A 型、腺病毒、风疹病毒、水痘-带状疱疹病毒和隐球菌无交叉反应。
7. 干扰物质：2g/ml 血红蛋白、18g/L 粘蛋白和 1.5×10^{10} 个/L 白细胞以及结核分枝杆菌治疗的药物包括利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、链霉素抗、卡那霉素、阿莫西林、肾上腺素、扎那米韦、莫匹罗星和布地奈德等对本试剂盒性能均无影响。

【注意事项】

1. 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验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
4. 实验室严格分区操作：
第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂；
第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理；
第三区：PCR 扩增区-PCR 扩增检测。
5. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
6. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
7. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
8. 加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
9. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待同一处理。
10. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1% 的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
11. 工作台及各种实验用品应定期用 1% 的次氯酸钠、75% 酒精或紫外灯进行消毒。
12. PCR 反应混合液应避光低温保存。
13. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
3. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology 11:1026-1030.
4. Chakravorty S, Tyagi JS. Novel multipurpose methodology for detection of mycobacteria in pulmonary and extrapulmonary specimens by smear microscopy, culture, and PCR[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(6):2697-2702.
5. Zaki ME, Shalaby HM. Polymerase chain reaction of pleural biopsy is a rapid and sensitive method for the diagnosis of tuberculous pleural effusion[J]. Chest, 2003, 124(6):2105-2111.
6. Attallah AM, Osman S, Saad A, et al. Application of a circulating antigen detection immunoassay for laboratory diagnosis of extra-pulmonary and pulmonary tuberculosis[J]. Clin Chim Acta, 2005, 356(1-2):58-66.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn

售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司

联系方式：0512-62525631 传真号码：0512-62956337 网址：www.medtl.cn

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋（NW-07）501 室

苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋（NW-06）504 室

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20173403277

【说明书核准日期及修改日期】2017.07.21