

【产品名称】

通用名：幽门螺旋杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】 单管单人份，20 人份/盒**【预期用途】**

本产品用于体外定性检测人胃粘膜组织活检标本中的幽门螺旋杆菌核酸。

幽门螺旋杆菌（*Helicobacter pylori*, Hp）是一种世界范围人类感染的病原菌，在人群中具有较高的感染率。部分 Hp 感染者会发展为慢性胃炎、十二指肠肠炎、消化性溃疡、胃癌、粘膜相关性淋巴瘤等疾病。本试剂盒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】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以幽门螺旋杆菌基因组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，用于胃粘膜组织中 Hp DNA 的定性检测。

胃粘膜组织活检标本使用本试剂盒提供的 DNA 提取试剂进行 DNA 提取，提取的核酸加入 PCR 反应管中，使用荧光 PCR 仪进行 PCR 扩增，并检测荧光信号。仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线，根据荧光背景信号确定阈值后，得到未知样本的阈循环值（CT 值），实现对未知样本的检测。

【主要组成成分】**1. 产品中包含的试剂组分**

组份名称	规格	数量
DNA 提取液	500μL/管	2
PCR 反应管	单管单人份	20
HP 阳性质控品	50μL/管	2
阴性质控品	120μL/管	1

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

其中，DNA 提取液主要组分为 NaOH、Tris-HCl（PH8.0）、Triton X-100、NP-40、Chelex-100、EDTA。PCR 反应管中包含反应所需的酶、引物、探针和反应缓冲液及用于分隔酶系和反应液的固体封盖剂。

2. 质控品说明

质控品包括阴性质控品和阳性质控品；

其中，阴性质控品为灭菌纯化水，阳性质控品为幽门螺旋杆菌标准株（已经过灭活处理）。将阴、阳性质控品与待检标本一起，按本说明书进行处理，用于评价核酸提取过程的有效性 & 环境监控。

【储存条件和有效期】

保存于 -20±5℃，避免反复冻融，有效期 6 个月。

试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】 ABI 7300 荧光检测仪，ABI 7500 荧光检测仪。**【样本要求】**

- 适用标本类型：人胃粘膜组织活检标本。
- 标本采集：专业医师在胃镜直视下取可疑病变部位（常见胃窦部）粘膜 2~3 块，置入无菌玻璃管，密闭送检。
- 标本保存和运送：标本可立即用于测试，也可长期保存于 -20℃。运送采用 0℃ 冰壶。

【检验方法】**1. DNA 提取****1.1 阴性质控品处理**

- ①取出阴性质控品，解冻后充分混匀，8,000rpm 离心数秒，取 50μL 至新的离心管中；
- ②加入 50μL DNA 提取液充分混匀，100℃ 恒温处理 10±1 分钟；

③12,000 rpm 离心 5 分钟，备用。

1.2 标本处理

- ①取粘膜组织至 1.5 ml 离心管中，加入 50μL 纯化水；
- ②加入 50μL DNA 提取液充分混匀，100℃恒温处理 10±1 分钟；
- ③12,000 rpm 离心 5 分钟，备用。

1.3 HP 阳性质控品处理

- ①取出 1 管阳性质控品，解冻后 8,000rpm 离心数秒；
- ②加入 50μL DNA 提取液充分混匀，100℃恒温处理 10±1 分钟；
- ③12,000 rpm 离心 5 分钟，备用。

2. 荧光 PCR

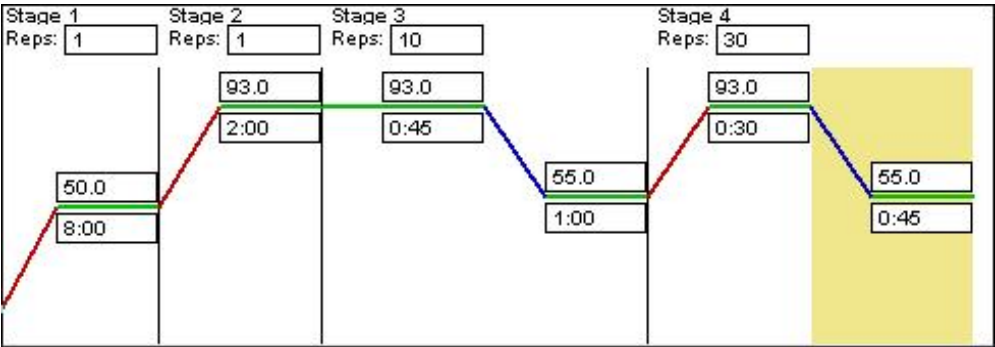
2.1 取 PCR 反应管若干，加入处理后的样品（标本、阴性质控品、阳性质控品）上清液 2μL，8,000rpm 离心数秒，放入仪器样品槽。

2.2 ABI Prism 7300 操作（ABI Prism 7500 参照此操作，具体仪器操作见各说明书）

①选中需设置的样品孔，双击打开 Well Inspector 窗口，通过 Add Detector 按钮添加探针荧光标记信号（Reproter Dye: FAM; Quencher Dye: TAMRA），

按对应顺序设置阴性质控品和未知标本（含阳性质控品），并在 Sample Name 栏中设置样品名称。Passive Reference 设置为 none，关闭窗口。

②打开 instrument 窗口设置循环条件：



50℃ 8 分钟，
93℃ 2 分钟，
93℃ 45 秒→55℃ 1 分钟→10 个循环，
93℃ 30 秒→55℃ 45 秒→30 个循环，
在 55℃ 45 秒收集荧光。
保存文件，运行。

2.3 结果分析

- ① 反应结束后保存检测数据文件。
- ② 分析条件设置：根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值、end 值（用户可根据实际情况自行调整，start 值可以在 1~10、stop 值可以在 5~20）。在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使基线位于扩增曲线指数期。选择 Analyze 自动分析结果。
- ③ 到 Report 窗口，记录未知标本 Ct 值。

3. 质控标准

- 3.1 阴性质控品：FAM 检测通路荧光信号无增长，无典型 S 型扩增曲线；
- 3.2 阳性质控品：增长曲线呈 S 型曲线且 Ct 值≤27.02。
以上要求需要同时满足，否则本次实验无效，需重新进行。

4. 试验结果的计算

以 ABI Prism 7300 为例（其它仪器参照此方法判定结果）

- 4.1 如果 FAM 检测通路荧光信号无增长，无典型 S 型曲线，则判样品的 HP DNA 浓度小于检测灵敏度。
- 4.2 如果 FAM 荧光信号增幅明显，扩增曲线呈典型 S 型曲线且 Ct 值≤27.02，则判定 HP DNA 阳性。
- 4.3 如果 FAM 荧光信号增幅明显，扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线，但 CT 值 > 27.02，则认为该样品处于灰度区，需复检进

行确定。

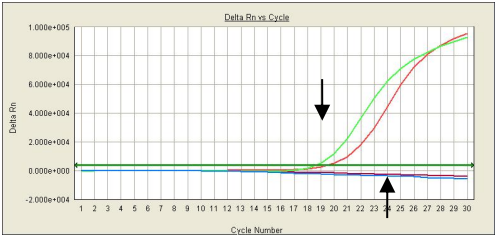
【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法确定本试剂盒的参考值为 27.02。

【检验结果的解释】

- 1. 每次实验均需检测阴性质控品，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. 阳性结果判定标准：FAM 荧光信号增幅明显，扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线，且 CT 值小于等于 27.02。
- 3. 阴性结果判定标准：FAM 检测通路荧光信号无增长，无典型 S 型扩增曲线。
- 4. 灰度区结果判定：如果 FAM 荧光信号增幅明显，扩增曲线呈典型 S 型扩增曲线，但 CT 值大于 27.02，为灰度区，处于灰度区的样本经复检符合阳性结果判定标准或仍处于灰度区均判定为阳性，符合阴性结果判定标准判定为阴性。
- 5. 如果检测样本中幽门螺旋杆菌发生了基因突变，则可能造成假阴性结果的出现。
- 6. 报告建议采用以下格式：
阴性结果报告格式为：样本未检测到幽门螺旋杆菌核酸，浓度低于试剂盒的灵敏度；
阳性结果报告格式为：样本检测到幽门螺旋杆菌核酸；
注：由于试剂盒灵敏度的限制及基因突变的发生，对本试剂盒检出的阴性结果不能完全排除阳性的可能，对于阳性结果则需进行进一步确认。
- 7. 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。
- 8. 示例：

样本 1 和 2 使用本试剂盒进行检测，上机图及检测结果见图 1 和表 1。图 1 包括阴性质控品、阳性质控品，待检测样本 1 和 2（箭头所指为待检样本扩增曲线）。



图一 扩增图

表一 检测结果

Sample Name	Detector	Task	Ct
HP-样本2	Qiu Geng	Unknown	Undet.
HP-样本1	Qiu Geng	Unknown	19.5482
HP-阳性质控品	Qiu Geng	Unknown	18.5873
HP-阴性质控品	Qiu Geng	NTC	Undet.

从以上图表可知，阳性质控品和阴性质控品均满足试剂盒要求，可以进行结果判定。由表 1 知，样本 1 的 CT 值为 19.54，样本 2 的 CT 值未检测到。

报告格式为：样本 1 检测到幽门螺旋杆菌核酸；样本 2 未检测到幽门螺旋杆菌核酸，其浓度低于试剂盒的灵敏度。

【检测方法的局限性】

样本检测结果和样本采集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果标本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

根据产品性能评估结果，本试剂盒的灵敏度为 1.0×10³ copies/ml。检测试剂与常见胃肠道致病菌（肠炎沙门氏菌，产气肠杆菌，鲍氏志贺氏菌，伤寒沙门氏菌，金黄色葡萄球菌，甲，乙，丙型副伤寒杆菌等）无交叉反应。

【注意事项】

- 1. 本品仅用于体外检测；
- 2. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在生物安全级别 2 级实验室操作，操作中使用的试管、吸头丢弃前需经灭菌处理。标本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

3. 试剂盒阳性质控品虽经验证菌液已灭活，但没有任何一种已知的测试方法可以完全确保灭活菌液不含有传染性物质。因此，操作时仍应将阳性质控品视为传染性物质处理；
4. 试剂盒中组分需在有效期内使用，不使用本试剂盒提供的组分进行实验将可能导致错误结果。
5. 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、标本制备区、扩增和产物分析区），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；
6. PCR 反应试剂不要长时间暴露在阳光下；使用前要完全解冻，但应避免反复冻融；
7. 试剂盒 DNA 提取液内含不溶于水的物质，取样时需用加样器充分混匀后吸取。如出现因吸头嘴部太细不能吸取或取样后堵塞吸头的现象，可先用洁净无污染的剪刀将吸头嘴部剪去一截；
8. 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℃，1 周内完成检测；
9. “C”表示加入 PCR 反应管中的模板浓度；
10. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；
11. 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。

【参考文献】

1. Kulipers EJ, Klinkenberg Knol EC, Vandenbroucke Granls CM, et al. Role of Helicobacter Pylori in the pathogenesis of atrophic gastritis. Scand J Gastroenterology, 1997, Suppl 223:28- 34
2. Sebastian Suerbaum and Christine Josenhans. Helicobacter pylori evolution and phenotypic diversification in a changing host. NATURE REVIEWS, volume 5, june, 2007, p. 441-452.
3. Claudia Schabereiter-Gurtner, Alexander M. Hirschl, Brigitte Dragosics, et al. Novel Real-Time PCR Assay for Detection of Helicobacter pylori Infection and Simultaneous Clarithromycin Susceptibility Testing of Stool and Biopsy Specimens. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Oct. 2004, p. 4512 - 4518.

【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：020-32290789, 400 000 0340

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：020-32290789, 400 000 0340

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；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号

【说明书批准日期及修改日期