

结核杆菌(TB)核酸扩增检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【产品名称】

通用名称：结核杆菌 (TB)核酸扩增检测试剂盒

(PCR 荧光探针法)

Name : Diagnostic Kit for Tubercle Bacillus DNA

(PCR Fluorescence Probing)

【包装规格】48T/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于检测咽拭子标本等样本中的结核杆菌，用于结核杆菌感染的辅助诊断，其检测结果仅供参考。

【检验原理】

本试剂盒用一对结核杆菌特异性引物，结合一条特异性探针，用荧光 PCR 技术对结核杆菌的核酸进行体外扩增检测，用于临床上对可疑感染者的病原学诊断。

【试剂组成】

名称	规格
核酸提取液	1.5ml×2 管
酶液	50μl×1 管
TB 反应液	1.0ml×1 管
TB 阳性质控品	50μl ×1 管
阴性质控品	250μl ×1 管

说明：不同批号的试剂盒组分不可交互使用。

【储存条件和有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期 12 个月；

避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不应超过 8 小时；运输采用干冰（或者冰袋）保持低温，运输时间不应超过 4 天。试剂盒生产日期见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7300、7500、ABI stepone / stepone plus 、安捷伦 MX3000P/3005P、MJ Opticon2 等其他荧光定量 PCR 检测仪。

【标本要求】

标本采集：采集病人的咽拭子标本，应使用专用采样拭子，适度涂抹咽后壁和两侧扁桃腺部位，应避免触及舌部；迅速将拭子放入标本采集管中，旋紧管盖并密封，以防干燥。

保存运输：上述标本短期内可保存于-20℃，长期保存可置-70℃，但不能超过 6 个月，标本运送应采用 2~8℃冰袋运输，严禁反复冻融。

【使用方法】

1. 样品处理（样本处理区）

1.1 样本前处理

取 100uL 拭子标本于 1.5mL 灭菌离心管中

1.2 DNA 提取

- 1) 对上述处理好的标本加入等体积核酸提取液(固体标本加入 50uL 核酸提取液)，100℃恒温处理 10 分钟，13,000 rpm 离心 5 分钟，取上清液转移至新的 1.5ml EP 管，-20℃保存；
- 2) DNA 的提取也可以采用广州维伯鑫生物科技有限公司生产的 DNA 提取试剂盒（离心柱提取法），请严格按照试剂盒说明书进行操作。

2. 试剂配制（试剂准备区）

根据待检测样本总数，设所需要的 PCR 反应管数为 N(N=样本数+1 管阴性对照+1 管阳性对照；样品每满 7 份，多配制 1 份)，每测试反应体系配制如下表：

试剂	TB 反应液	酶液
用量（样本数为 N）	20μl	1μl

3. 加样（样本处理区）

将步骤 1 提取的 DNA、阳性质控品、阴性质控品各取 4μl，分别加入相应的反应管中，盖好管盖，混匀，短暂离心。

4. PCR 扩增（核酸扩增区）

- 4.1 将待检测反应管置于荧光定量 PCR 仪反应槽内；
- 4.2 设置好通道、样品信息，反应体系设置为 25ul；

荧光通道选择：检测通道 (Reporter Dye) FAM，淬灭通道 (Quencher Dye) NONE，请勿选择 ROX 参比荧光。

4.3 推荐循环参数设置：

步骤	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1 cycle	95℃	10min	否
2	40 cycle	94℃	15sec	否
		55℃	30sec	是

5. 结果分析判定

5.1 结果分析条件设定

设置 Baseline 和 Threshold：一般直接按机器自动分析的结果分析，当曲线出现整体倾斜时，根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值(一般可在 3~15 范围内调节)、stop 值(一般可在 5~20 范围内调节)，以及 Threshold 的 Value 值(上下拖动阈值线至高于阴性对照)，重新分析结果。

5.2 结果判断

阳性：检测通道 Ct 值≤35.0，且曲线有明显的指数增长曲线；

可疑：检测通道 35.0<Ct 值≤37，建议重复检测，如果检测通道仍为 35.0<Ct 值≤37，且曲线有明显的增长曲线，判定为阳性，否则为阴性；

阴性：样本检测结果 Ct 值>37 或无 Ct 值。

6. 检测方法的局限性

- > 样本检测结果与样本收集、处理、运送以及保存质量有关；
- > 样本提取过程中没有控制好交叉污染，会出现假阳性结果；
- > 阳性对照、扩增产物泄漏，会导致假阳性结果；
- > 病原体在流行过程中基因突变、重组，会导致假阴性结果；
- > 不同的提取方法存在提取效率差异，会导致假阴性结果；
- > 试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，出现假阴性或定量检测不准确的结果；
- > 本检测结果仅供参考，如须确诊请结合临床症状以及其他检测手段。

7. 质控标准

阴性质控品：无明显扩增曲线或无 Ct 值显示；

阳性质控品：扩增曲线有明显指数生长期，且 Ct 值≤32；

以上条件应同时满足，否则实验视为无效。

8. 产品性能指标

阴阳性参考品符合率：8 份阳性参考品符合率为 100%；10 份阴性参考品符合率为 100%。

最低检测限：2.0×10²copies/ml。

精密度：批内、批间精密度检测 Ct 值的变异系数 (CV) 均≤3%。

【注意事项】

- > 所有操作严格按照说明书进行；
- > 试剂盒内各种组分使用前应自然融化，**完全混匀**并短暂离心；
- > 反应液应避光保存；
- > 反应中尽量**避免气泡存在**，管盖需盖紧；
- > 使用一次性吸头、一次性手套和各区专用工作服；
- > **样本处理、试剂配制、加样需在不同区进行**，以免交叉污染；
- > 实验完毕后用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器；
- > 试剂盒里所有物品应视为污染物对待，并按照《微生物医学实验室生物安全通则》进行处理。

【生产企业】

企业名称：广州维伯鑫生物科技有限公司

邮 编：510663

生产地址：广州黄埔区科丰路 31 号华南新材料创新园 G11 栋 2 层

电子邮箱：info@vipotion.com

电 话：020-66377266

公司网址：http://www.vipotion.com

传 真：020-66377267