

受理号：CSZ2100091

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：分枝杆菌鉴定试剂盒（荧光 PCR 熔解  
曲线法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：厦门致善生物科技股份有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

## 目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
技术审评概述.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究概述.....	5
三、 临床评价概述.....	9
四、 产品受益风险判定.....	11
综合评价意见.....	12

## 基本信息

### 一、申请人名称

厦门致善生物科技股份有限公司

### 二、申请人住所

厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼

### 三、生产地址

厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼；

厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 11 号厂

房 3 层 A 区

## 技术审评概述

### 一、产品概述

#### (一) 产品主要组成成分

本试剂盒含有分枝杆菌 PCR 反应管、分枝杆菌阳性对照、分枝杆菌阴性对照、PCR 八联管管盖，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	分枝杆菌 PCR 反应管	引物、探针、dNTPs、聚合酶、UNG 酶、内控基因 SUC2 模板、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA•2Na)	8 测试/条	6 条
对照试剂	分枝杆菌阳性对照	分枝杆菌阳性质粒、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA•2Na)	10 测试/支	1 支
	分枝杆菌阴性对照	三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA•2Na)	10 测试/支	1 支
耗材	PCR 八联管管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	6 条

#### (二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测分枝杆菌培养物样本中的 19 种分枝杆菌核酸，包括：结核分枝杆菌（复合群）、耻垢分枝杆菌、牛分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、龟分枝杆菌、猿猴分枝杆菌、缓黄分枝杆菌、戈登分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、偶然分枝杆菌、海分枝杆菌或溃疡分枝杆菌、

土地分枝杆菌、不产色分枝杆菌、苏加分枝杆菌、马尔摩分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌。

本产品适用于临床上分枝杆菌感染的辅助诊断。

### **(三) 产品包装规格**

48 测试/盒。

### **(四) 产品检验原理**

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，根据不同分枝杆菌 ITS 片段的特异序列设计探针，采用特定的荧光通道和熔点进行分枝杆菌的鉴别。同时在体系中加入外源性内控模板（拟南芥管家基因 SUC2 作为参照基因），对扩增体系进行质量控制。

## **二、临床前研究概述**

### **(一) 主要原材料**

本产品主要原材料包括：引物、探针、聚合酶、UNG 酶、dNTPs、质粒原料等。主要原材料聚合酶和质粒原料为自产，其他原材料均为外购。引物、探针为申请人自行设计后由专业合成公司合成。申请人选择有资质的供应商提供的原料，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

企业参考品设置情况：申请人设计了完整的企业参考品，包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性参考品等，均采用真实样本灭活后制备而成。阳性参考品来

源于 30 份检测范围内分枝杆菌样本制备而成，阴性参考品来源于 25 份检测范围外分枝杆菌样本或不含分枝杆菌样本制备而成，检测限参考品来源于 5 份检测范围内分枝杆菌样本制备而成，重复性参考品来源于 5 份检测范围内分枝杆菌样本制备而成。

## （二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。申请人对反应体系中引物、探针、聚合酶、UNG 酶和 dNTPs 等的浓度和用量进行了优化，并对反应体系的扩增程序、退火温度、退火时间、扩增循环数、样本用量等进行了优化和验证，此外对样本核酸的提取方法和取样量进行了验证，通过验证最终确定了最佳反应体系。

## （三）分析性能评估

该产品分析性能主要包括：核酸提取性能、阴阳性符合率、精密度、最低检测限、特异性（交叉反应、干扰试验）、包容性研究等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的不少于三批的产品在适用机型 SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统上的性能评估资料。

在核酸提取性能研究中，比较评估了产品配套使用的核酸提取试剂盒的提取效果，结果表明配套使用的核酸提取试剂盒的核酸提取性能满足产品使用需求。

在阴阳性符合率研究中，申请人采用不少于三批的成品

试剂盒，检测企业阳性参考品、阴性参考品和临床样本。结果表明阳性符合率和阴性符合率均为 100%。

在精密度研究中，申请人采用不少于三批的成品试剂盒，对两种不同浓度的 19 份阳性样本和 4 份阴性样本，进行了多天的精密度研究，评估了试剂盒批内/批间、日内/日间、不同操作者之间等的精密度。结果表明：试剂盒批内/批间、日内/日间、不同操作者之间的精密度均符合要求。

在最低检测限研究中，申请人采用不少于三批的成品试剂盒，检测 19 种分枝杆菌的系列浓度梯度样本，将达到 100% 阳性检出率的最低浓度水平作为确定的最低检测限，并进行最低检测限验证。最终确定该产品最低检测限为  $10^3$  菌/mL。

在交叉反应研究中，申请人采用不少于三批的成品试剂盒，进行了近源菌及不在试剂盒检测范围中的呼吸道感染相关病原体等的交叉反应。结果表明：本试剂盒与亚洲分枝杆菌、胃分枝杆菌、施氏分枝杆菌、次要分枝杆菌、产鼻疽分枝杆菌、草分枝杆菌、抗热分枝杆菌、金色分枝杆菌、微黄分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、科莫斯分枝杆菌、新金色分枝杆菌、副偶然分枝杆菌、猪分枝杆菌、灰尘分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌、田野分枝杆菌、南非分枝杆菌、迪氏分枝杆菌、母牛分枝杆菌、肺炎球菌、嗜肺军团菌、百日咳博德特氏菌、巴西诺卡氏菌、北京棒杆菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、隐球菌、绿脓杆菌、白色念

珠菌、人流感病毒 A 型、人流感病毒 B 型、人副流感病毒 1 型、人副流感病毒 2 型、人副流感病毒 3 型无交叉反应。

在干扰试验研究中，申请人采用不少于三批的成品试剂盒，对样本中可能含有的干扰物质进行了研究，包括常见的外源干扰物质利福平（9 mg/L）、异烟肼（12 mg/L）、乙胺丁醇（8 mg/L）、吡嗪酰胺（45 mg/L）、卡那霉素（30 mg/L）、链霉素（50 mg/L）、阿莫西林（11 mg/L）、扎那米韦（0.5 mg/L）、肾上腺素（1 mg/L）、地塞米松（20 mg/L）、莫匹罗星（20 mg/L）药物等，结果显示相应干扰物质不会对产品的检测结果产生干扰。

在包容性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对标准菌株及收集于不同地区的不同来源的各目标菌的阳性样本进行检测。包括：结核分枝杆菌（含 H37RV 菌株）、非洲分枝杆菌、田鼠分枝杆菌、牛分枝杆菌（含 ATCC35743 菌株和 BCG 菌株）、耻垢分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、龟分枝杆菌、猿猴分枝杆菌、缓黄分枝杆菌、戈登分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、偶然分枝杆菌、海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、土地分枝杆菌、不产色分枝杆菌、苏加分枝杆菌、马尔摩分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌。检测结果表明，本试剂检测不同地区收集的上述不同种类分枝杆菌均能检出。

#### **（四）阳性判断值**

申请人采用该产品和配套仪器对收集的临床样本进行检测，获得原始的  $T_m$  值，通过对相应样本的数据分布进行统计分析并计算标准偏差制定各指标的参考区间。采用多例样本进行参考区间的验证，根据验证结果最终确定了试剂盒的参考区间。

### **(五) 稳定性研究**

申请人对本产品的实时稳定性、开封稳定性、冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性等进行了系统的研究，确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

实时稳定性：试剂盒分别储存于  $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$  和  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  温度下，在不同时间点对试剂盒的外观、最低检测限、特异性和精密度等性能进行考察。结果表明试剂盒在  $-25 \sim 8^{\circ}\text{C}$  避光保存，有效期 18 个月。

## **三、 临床评价概述**

申请人在武汉市肺科医院（武汉市结核病防治所）、广州市胸科医院、福建省福州结核病防治院共三家临床机构完成了临床试验。临床试验主要包括两部分内容：

第一部分，采用试验用体外诊断试剂与核酸序列测定方法进行对比试验，对产品临床性能进行评价。共计入组 1604 例疑似肺结核、疑似分枝杆菌感染等病例的临床培养物样本，其中胞内分枝杆菌阳性 534 例、不产色分枝杆菌阳性 23 例、蟾蜍分枝杆菌阳性 26 例、耻垢分枝杆菌阳性 28 例、戈

登分枝杆菌阳性 43 例、龟分枝杆菌阳性 29 例、海分枝杆菌或溃疡分枝杆菌阳性 35 例、缓黄分枝杆菌阳性 20 例、结核分枝杆菌（复合群）阳性 87 例、堪萨斯分枝杆菌阳性 55 例、瘰疬分枝杆菌阳性 26 例、马尔摩分枝杆菌阳性 26 例、鸟分枝杆菌阳性 104 例、牛分枝杆菌阳性 20 例、脓肿分枝杆菌阳性 338 例、偶然分枝杆菌阳性 61 例、苏加分枝杆菌阳性 37 例、土地分枝杆菌阳性 19 例、猿猴分枝杆菌阳性 21 例。对比试验结果显示，针对以上 19 种适用的分枝杆菌类型，试验体外诊断试剂检测与核酸序列测定的阳性符合率均为 100%，阴性符合率均不低于 97%；总体样本检测符合率为 98.57%（95%IC：97.86%，99.04%）。

第二部分，采用试验体外诊断试剂与已上市同类产品进行对比试验，对产品临床性能进行评价，对比试剂选择成都博奥晶芯生物科技有限公司生产的分枝杆菌菌种鉴定试剂盒（DNA 微阵列芯片法）。试验共计入组 338 例疑似肺结核、疑似分枝杆菌感染等病例的临床培养物样本，适用的分枝杆菌类型均有一定阳性例数，对比试验结果显示总符合率 92.90%（95%CI：89.65%，95.18%），一致性良好。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求，临床试验结果显示该产品与核酸序列测定、已上市同类产品检测结果一致性良好，临床性能满足临床需求。

#### 四、产品受益风险判定

根据申请人提供的申报资料，经综合评价，在目前认知水平上，认为该产品能够较大程度地满足医疗需求，预期为适用人群带来的受益大于风险。

## 综合评价意见

本申报项目为境内第三类体外诊断试剂产品注册，属于优先审批项目（编号：CSZ2100091）。申请人的注册申报材料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第 680 号）、《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 2014 年第 5 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。

2022 年 10 月 20 日

附件：产品说明书

## 分枝杆菌鉴定试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

### 【产品名称】

通用名称：分枝杆菌鉴定试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

### 【包装规格】

48 测试/盒

### 【预期用途】

本产品用于体外定性检测分枝杆菌培养物样本中的 19 种分枝杆菌核酸，包括：结核分枝杆菌（复合群）、耻垢分枝杆菌、牛分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、龟分枝杆菌、猿猴分枝杆菌、缓黄分枝杆菌、戈登分枝杆菌、堪萨斯分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、偶然分枝杆菌、海分枝杆菌或溃疡分枝杆菌、土地分枝杆菌、不产色分枝杆菌、苏加分枝杆菌、马尔摩分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌。

结核病和非结核病是由分枝杆菌感染引起的慢性传染病，在全球范围内广泛流行并严重威胁着公共健康安全。2016 年，全球新发结核病患者 1040 万，死亡人数 167 万（死亡率 16%），我国新发结核病人达到了 89.5 万，占全球发病人数的 8.6% [1]；我国历次结核病流行病学调查资料显示，非结核分枝杆菌（nontuberculous mycobacteria, NTM）的分离率从 1990 年的 4.9% 上升至 2010 年的 22.9% [2]。非结核病与结核病的临床症状表现极为相似，但 NTM 与结核分枝杆菌复合群（MTBC）对药物的敏感性不同，多数 NTM 对抗结核药物天然耐药；其次，不同 NTM 对药物的敏感性亦不相同 [3-5]。因此，临床上对分枝杆菌感染的检测具有重大的意义。当前应用于分枝杆菌检测的主要方法有分离鉴定培养法、DNA 测序法、荧光 PCR 熔解曲线法和 PCR 反向点杂交法等。本产品适用于临床上分枝杆菌感染的辅助诊断。

### 【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，根据不同分枝杆菌 ITS 片段的特异序列设计探针，采用特定的荧光通道和熔点进行分枝杆菌的鉴别。同时在体系中加入外源性内控模板（拟南芥管家基因 SUC2 作为参照基因），对扩增体系进行质量控制。

### 【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	分枝杆菌 PCR 反应管	引物、探针、dNTPs、聚合酶、UNG 酶、内控基因 SUC2 模板、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA·2Na)	8 测试/条	6 条
	分枝杆菌阳性对照	分枝杆菌阳性质粒、三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA·2Na)	10 测试/支	1 支
对照试剂	分枝杆菌阴性对照	三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA·2Na)	10 测试/支	1 支
	PCR 八联管管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	6 条

注：建议不同批号组分之间不互换。核酸提取试剂未包含在本试剂盒中。使用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 结核分枝杆菌核酸提取 Maxi 试剂（货号：604215；备案号：闽厦械备 20170046）。

### 【储存条件及有效期】

-25~8℃ 避光保存，有效期 18 个月。

拆封后未使用的反应管若未打开泡罩，应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 -25~8℃ 避光保存且在 8 个月内用完；打开泡罩包装的剩余试剂应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 2~8℃ 避光保存且在 1 个月内用完。可于 -18℃~37℃ 的温度范围内运输，运输时间不超过 14 天。生产日期及失效日期见包装标签。

阴性对照和阳性对照为干试剂时，可于 -25~8℃ 避光保存；当对照品用纯化水溶解后，可于 -18℃ 下保存且在 8 个月内用完，冻融次数不超过 10 次。

### 【适用仪器】

全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S; 上海宏石医疗科技有限公司)。

### 【样本要求】

经培养的分枝杆菌菌株（培养物）。分枝杆菌培养物样本置于 -20℃ 以下条件可保存至少 8 个月，置于 -70℃ 以下条件可保存至少 24 个月；提取后的基因组 DNA 可保存于 -20℃ 以下条件，尽量避免反复冻融，并于 6 个月之内完成实验，若需长期保存，则置于 -70℃ 以下条件，可保存至少 18 个月。

培养菌样本预处理：固体培养基上生长的分枝杆菌，用 22 SWG 标准接种环收集细菌 1 环，并重悬于 300 μL 裂解液 F5 中。液体培养基中生长的分枝杆菌取 1 mL，12000 rpm 离心 5 min，吸弃上清，加入 300 μL 裂解液 F5 重悬。将重悬后的细菌 99℃ 加热 10 min 后平衡至室温。（此步骤处理完成之后，若没有立即进行后续操作，请务必将处理完的样本放入 -18℃ 以下保存。）

### 【检验方法】

#### 1. 试剂准备——配液区

- ① 首先从试剂盒中取出铝箔袋，撕开封口，打开自封条，然后打开分枝杆菌 PCR 反应管的泡罩包装，取出 n 测试试剂（n 根据当次实验需要确定），剩余的试剂放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 8℃ 以下避光保存。
- ② 取出 n 测试透明 PCR 八联管管盖（n 根据当次实验需要确定），剩余的管盖放回自封袋并将封条封紧。
- ③ 将待用的分枝杆菌 PCR 反应管、透明 PCR 八联管管盖、分枝杆菌阳性对照和分枝杆菌阴性对照转移至提取间，于 8℃ 以下避光保存直至样本提取完。

#### 2. 样本提取及加样——提取区

- ① 使用厦门致善生物科技股份有限公司的 Lab-Aid 824 结核分枝杆菌核酸提取 Maxi 试剂进行提取。（模板可保存于 -20℃，并于 1 个月内完成试验。注意不要反复冻融样品。）
- ② 打开原装的分枝杆菌 PCR 反应管管盖并丢弃，用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入 25 μL 相应的提取样本或阴性/阳性对照品，之后立即盖严待用的透明 PCR 八联管管盖。

注：本试剂盒采用阳性对照和阴性对照进行质量控制，因此每次实验应设置阳性和阴性对照。阳性/阴性对照在第一次使用前，需先离心 1min，然后分别加入 250 μL 的处理后纯化水进行溶解，充分振荡混匀 20 s，瞬时离心。溶解后的阴性/阳性对照品于 -18℃ 以下贮存，反复冻融 ≤ 6 次。若需多次使用，可适量分装后备用。

③ 将已加入模板的 PCR 薄壁反应管于涡旋振荡器中充分振荡混匀 20 s，瞬时离心数秒，除去气泡。

④ 将离心后的 PCR 薄壁反应管转移至 PCR 扩增区。

### 3. PCR 扩增及熔解曲线分析——扩增区

扩增与熔解曲线分析步骤为一个程序，在全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S; 上海宏石医疗科技有限公司) 上连续完成。

① 反应程序设定如下:

体系	本试剂盒反应体系设为 25 $\mu$ L		
PCR 反应程序	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	50 $^{\circ}$ C 2 分钟	1
	预变性	95 $^{\circ}$ C 10 分钟	1
	PCR 循环程序	95 $^{\circ}$ C 15 秒	55
		57 $^{\circ}$ C 20 秒	
78 $^{\circ}$ C 20 秒			
保温	40 $^{\circ}$ C 30 分钟	1	
熔解分析程序	95 $^{\circ}$ C 2 分钟	1	
	40 $^{\circ}$ C 2 分钟		
	40 $^{\circ}$ C~90 $^{\circ}$ C, 采集 FAM、HEX、ROX、Cy5 通道荧光信号, 连续采光, 升温速率 0.04 $^{\circ}$ C/s		

② 程序运行完毕, 将 PCR 薄壁反应管 (闭管) 取出放入凹凸袋, 将封口封严, 按污染源处理。

### 4. 结果分析

当单次实验的阳性对照和阴性对照的数值在下述参考值范围内, 则单次实验有效, 可进行样本类型的分析和判读。判读方法详见检验结果的解释。

分枝杆菌阳性对照参考值范围如下:

FAM 通道 61.4 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C (结核分枝杆菌复合群特异熔点);

ROX 通道 71.8 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C (分枝杆菌属特异熔点);

ROX 通道 78.4 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C (内控熔点)。

分枝杆菌阴性对照参考值范围如下:

ROX 通道 78.4 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C (内控熔点), 其它通道应无熔解峰。

#### 【参考区间】

试剂盒所覆盖的 19 种分枝杆菌在 ROX 通道应具有分枝杆菌属和内控特异熔解峰, 范围为: ROX 通道: 71.8 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C, 78.4 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C; 此外各分枝杆菌特异的熔点如下:

1. 耻垢分枝杆菌: FAM 通道 81.7 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C;
2. 牛分枝杆菌: FAM 通道 61.3 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C, 73.9 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C;
3. 瘰癧分枝杆菌: FAM 通道 67.7 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C;
4. 结核分枝杆菌 (复合群): FAM 通道 61.4 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C;
5. 龟分枝杆菌: FAM 通道 54.3 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C;
6. 猿猴分枝杆菌: HEX 通道 80.0 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C;
7. 缓黄分枝杆菌: HEX 通道 76.0 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C;
8. 戈登分枝杆菌: HEX 通道 70.2 $\pm$ 1.9 $^{\circ}$ C;
9. 堪萨斯分枝杆菌: HEX 通道 64.4 $\pm$ 2.0 $^{\circ}$ C;
10. 脓肿分枝杆菌: HEX 通道 51.7 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C 或 57.4 $\pm$ 2.1 $^{\circ}$ C;
11. 偶然分枝杆菌: ROX 通道 64.6 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C;
12. 海分枝杆菌或溃疡分枝杆菌: ROX 通道 57.8 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C;
13. 土地分枝杆菌: ROX 通道 54.7 $\pm$ 1.5 $^{\circ}$ C;
14. 不产色分枝杆菌: ROX 通道 47.3 $\pm$ 1.8 $^{\circ}$ C;
15. 苏加分枝杆菌: Cy5 通道 80.4 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C;
16. 马尔摩分枝杆菌: Cy5 通道 75.0 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C;
17. 蟾蜍分枝杆菌: Cy5 通道 70.6 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C;
18. 胞内分枝杆菌: Cy5 通道 65.0 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C;
19. 鸟分枝杆菌: Cy5 通道 58.9 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C;

以上各分枝杆菌的参考  $T_m$  值由全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S; 上海宏石医疗科技有限公司) 软件自动输出。 $T_m$  值以仪器自动判读所得为准。当出现仪器无法自动给出  $T_m$  值时, 可通过人工设定特定基因型的峰高阈值获得  $T_m$  值。

#### 【检验结果的解释】

检测结果将由软件自动输出, 其判读原理如下:

通过所检测样品各通道熔解曲线的熔点 ( $T_m$  值) 的组合判断样品的分枝杆菌类型。首先, 对于每一份样本, 其在 ROX 通道 78.4 $\pm$ 1.7 $^{\circ}$ C 处应有熔解峰 (内控), 否则该样本检测无效; 其次, 根据样本在 ROX 通道 71.8 $\pm$ 1.6 $^{\circ}$ C 处是否有熔解峰进行判读, 若无熔解峰, 则样本不含分枝杆菌, 判读结束; 若有熔解峰则样本含分枝杆菌, 进一步判读, 分 2 种情况: 1) 根据“参考区间”分枝杆菌特异的熔点范围判读样本中具体含有哪一种分枝杆菌; 2) “参考区间”未覆盖的其它熔点范围或其他通道均无熔解峰的情况, 则判读为“分枝杆菌属”。若判读结果中含“分枝杆菌属”, 建议复检 2 次, 若 2 次结果一致, 则根据一致的情况进行结果判读; 若出现结果不一致的情况, 建议重新取样后复检; 检测结果确认为“分枝杆菌属”时, 可用其它检测方法进一步确认具体型别。

关于混合感染样品结果的判读: 当四个通道内, 除了 ROX 通道的内控峰和分支杆菌属的熔解峰以外, 出现两个或者多个特异的熔解峰, 根据其熔点判读相应的菌种。包含 2 种或 2 种以上分枝杆菌的样品为混合感染样品。

阳性对照的判读: 在 FAM、ROX 通道均有对应熔解峰, 且符合参考值范围, 对应结果为结核分枝杆菌 (复合群), 则可判定为阳性对照合格。若阳性对照不合格, 则判定该次实验结果失效。

阴性对照的判读: 阴性对照是没有加入模板的 DNA 溶解液, 因体系中有加入外源内控, 可对反应体系进行质量控制, 同时可质控样品在加样操作过程中是否发生了污染或空气中气溶胶的污染。若阴性对照除了内控峰外, 其他任一通道出现熔解峰, 则提示操作环境中可能有核酸污染。同步检测的样本可能出现假阳性的结果。

实验室环境污染、试剂污染、样品交叉污染会出现假阳性结果; 试剂运输、保存不当或试剂配制不准确会引起试剂检测效能下降, 出现假阴性或检测不准确的结果

#### 【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于定性检测分枝杆菌, 检测结果不作为定量分析的依据。
2. 不合理的样本采集、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
3. 阴性结果不能完全排除分枝杆菌的存在, 样本中菌株细胞过少、过度降解、基因缺失或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成阴性结果。
4. “分枝杆菌属”的判读结果不能完全排除样本中不含体系中覆盖的 19 种分枝杆菌的情况。当样本中靶基因浓度过低, 可能导致体系中覆盖的 19 种分枝杆菌的特征峰不能正常升起, 而分枝杆菌属特异的熔解峰可正常升起的情况。
5. 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。未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果。
6. 由于牛分枝杆菌比其他结核分枝杆菌复合群成员多一个特异熔解峰, 因此, 当牛分枝杆菌和其他结核分枝杆菌复合群成员联合感染时, 该试剂盒无法确认其他结核分枝杆菌复合群成员的阳性情况。
7. 当土地分枝杆菌与海分枝杆菌或溃疡分枝杆菌联合感染时, 该试剂盒只能鉴定出海分枝杆菌或溃疡分枝杆菌, 无法确认土地分枝杆菌的阳性情况。
8. 本试剂盒检测胞内分枝杆菌和鸟分枝杆菌时可能与试剂盒检测范围外的鸟分枝杆菌复合群其他菌种发生交叉反应, 临床试验中此种不一致比例约为 3.48% (23/661)。

#### 【产品性能指标】

1. 重复性：检测分枝杆菌重复性参考品，结果为对应的分枝杆菌型别，并且 Tm 值的变异系数 CV 值均不应高于 2%。
2. 特异性：1) 交叉反应：检测分枝杆菌菌株参考品，其中试剂盒所覆盖检测范围的 19 种分枝杆菌（即阳性参考品），试剂盒覆盖之外的 20 种分枝杆菌（即阴性参考品，包括亚洲分枝杆菌、胃分枝杆菌、施氏分枝杆菌、次要分枝杆菌、产鼻疽分枝杆菌、草分枝杆菌、抗热分枝杆菌、金色分枝杆菌、微黄分枝杆菌、浅黄分枝杆菌、科莫斯分枝杆菌、新金色分枝杆菌、副偶然分枝杆菌、猪分枝杆菌、灰尘分枝杆菌、塞内加尔分枝杆菌、田野分枝杆菌、南非分枝杆菌、迪氏分枝杆菌和母牛分枝杆菌），检测结果符合率为 100%；此外，对可能产生交叉反应的常见病原体（包含肺炎球菌、嗜肺军团菌、百日咳博德特氏菌、巴西诺卡氏菌、北京棒杆菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、隐球菌、绿脓杆菌、白色念珠菌、人流感病毒 A 型、人流感病毒 B 型、人副流感病毒 1 型、人副流感病毒 2 型、人副流感病毒 3 型）进行验证，检测结果均为阴性（不含分枝杆菌）。2) 干扰试验：常见的外源干扰物质如利福平、异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、卡那霉素、链霉素、阿莫西林、扎那米韦、肾上腺素、地塞米松、莫匹罗星等药物，以及内源干扰物质如血液（30%V/V）、粘液（30%V/V）、人细胞（ $1 \times 10^{10}$ /L）、唾液（30%V/V）等，对检测结果均无影响。
3. 试剂盒最低检出限为： $10^3$  菌/mL。
4. 临床评价：本产品在三家临床单位以核酸序列测定为对比方法，共计检测了 1604 例临床培养物样本，与核酸序列测定结果对比，本产品检测临床培养物样本的阳性符合率均为 100%，阴性符合率均不低于 97%；总体样本检测符合率为 98.57%；同时，以对比试剂为对比方法检测了 338 例临床培养物样本，对比试验结果显示一致性良好，总体符合率 92.90%。

#### 【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，操作人员必须经过培训且具有一定的经验，试剂盒使用前请仔细阅读说明书全文。
2. 请严格按照基因扩增检验实验室的管理规范进行试验操作：如 PCR 试验严格分区操作；各区应有专用的手套、移液器等，不得交叉使用，避免污染；工作人员应遵循从一区到二区的单方向工作原则，各工作区相对隔离；进行 PCR 试验的工作桌面及相关物品应定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精、1mol/L 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒。

3. 试验操作所需的消耗用品应一次性使用，使用前进行无菌处理。
4. 冻存的阴性/阳性对照品溶液在使用前应充分融化，并振荡混匀，短暂离心。PCR 反应管加入模板后应充分振荡混匀并瞬时离心，上机前应避免振摇，应注意检查各反应管是否盖紧，以免污染仪器。
5. PCR 反应管应避光保存，每次试验应设置阴性和阳性对照。
6. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
7. 对照品尽量避免反复冻融，应控制反复冻融 $\leq 10$  次。如果需要多次使用，请在第一次溶解后将阳性对照分装冻存，再根据需要取用。
8. 反应结束后，需将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入凹凸袋，将封口封严，按污染源处理。

#### 【参考文献】

1. World Health Organization (WHO). Global tuberculosis report 2017 [R/OL]. [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/](http://www.who.int/tb/publications/global_report/). Geneva, Switzerland. WHO, 2016.
2. 中华医学会结核病学分会. 非结核分枝杆菌病诊断与治疗专家共识. *中华结核和呼吸杂志*. 2012, 35:572.
3. David, E. G.; Timothy, A.; Barbara, A.; et al. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2007, 175, 367.
4. Wang, X.; Li, H.; Jiang, G.; et al. *Emerg. Infect. Dis.* 2014, 20, 1252.
5. Nie, W.; Duan, H.; Huang, H.; et al. *Biomed. Res. Int.* 2015, 506.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：厦门致善生物科技股份有限公司

住所：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼；

厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 11 号厂房 3 层 A 区

生产许可证编号：

#### 【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】