

受理号：CSZ2300354

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：猴痘病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：广州达安基因股份有限公司

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.....	6
三、 临床评价概述.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	16

## 基本信息

### 一、申请人名称

广州达安基因股份有限公司。

### 二、申请人住所

广州市高新技术产业开发区香山路 19 号。

### 三、生产地址

广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

# 技术审评概述

## 一、产品概述

### (一) 产品主要组成成分

本试剂盒主要组成成分包括猴痘病毒 MPXV PCR 反应液 A、MPXV PCR 反应液 B、MPXV 阴性质控品、MPXV 阳性质控品，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

组分名称	规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (大包装, 24 人份/盒)	MPXV PCR 反应液 A 510 μL/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	MPXV PCR 反应液 B 105 μL/管	1	热启动 Taq 抗体酶、Taq 酶、dNTPs、UDG 酶
PCR 检测试剂 (大包装, 48 人份/盒)	MPXV PCR 反应液 A 935 μL/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	MPXV PCR 反应液 B 195 μL/管	1	热启动 Taq 抗体酶、Taq 酶、dNTPs、UDG 酶
质控品 (适用于大包装, 24 人份/盒; 大包装, 48 人份/盒)	MPXV 阴性 质控品 450 μL/管	1	MPXV 内标片段 (RNase P) 的假病毒
	MPXV 阳性 质控品 450 μL/管	1	MPXV 目的片段的假病毒、MPXV 内标片段 (RNase P) 的假病毒

备注: 不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

## （二）产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测猴痘疑似病例，其他需要进行猴痘病毒感染诊断或鉴别诊断者的皮肤病变样本（皮疹表面和/或渗出物的拭子）、咽拭子样本中猴痘病毒 F3L 基因。

有关“疑似病例”等人群的定义参照《猴痘诊疗指南》及《猴痘防控技术指南》等文件执行。

本试剂盒在使用上应当遵守《猴痘诊疗指南》及《猴痘防控技术指南》等文件的相关要求。

开展猴痘病毒核酸检测，应符合《猴痘病毒实验室检测技术指南》等的要求，做好生物安全工作。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

## （三）产品包装规格

大包装，24 人份/盒；大包装，48 人份/盒。

## （四）产品检验原理

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以猴痘病毒（MPXV）F3L 基因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，用于样本中猴痘病毒 DNA 的定性检测。本试剂盒包括内源性内标（RNase P 基因）检测系统，用于

对本标采集、核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控，可减少假阴性结果的出现。本试剂盒同时添加了防污染组分（尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG 酶），其作用机理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。

## 二、临床前研究概述

### （一）主要原材料

#### 1. 主要原材料的选择

该产品在制备过程中主要原材料包括引物、探针、热启动 Taq 抗体酶、UDG 酶、Taq 酶、dNTPs（dATP、dCTP、dGTP、dUTP）、MPXV 内标片段（RNase P）的假病毒、MPXV 目的片段的假病毒等。其中 MPXV 内标片段（RNase P）的假病毒、MPXV 目的片段的假病毒由申请人自制，其他原材料均为外购方式获得。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质量要求并经检验合格。

#### 2. 企业参考品和质控品设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检出限参考品和精密度参考品。参考品组成如下：

阳性参考品 5 份：由 5 份不同浓度的病毒样本组成；

阴性参考品 10 份：由与猴痘病毒相近或引起症状相似的交叉反应病原体样本组成；

检出限参考品 4 份：由 4 份不同浓度的病毒样本组成，其中包括试剂盒检出限浓度水平；

精密度参考品 3 份：由高、低浓度水平和阴性样本组成。

本产品设置了 MPXV 阴性质控品为 MPXV 内标片段 (RNase P) 的假病毒；MPXV 阳性质控品为 MPXV 目的片段的假病毒、MPXV 内标片段 (RNase P) 的假病毒，用于检测过程中试剂盒和仪器的质量控制。此外，PCR 检测体系还含有内源性内标检测系统，通过检测内标基因用于对标本采集、核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控，可减少假阴性结果的出现。

## (二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业内部试验确定最佳的生产工艺及反应体系，包括 PCR 缓冲液、PCR 反应液、质控品的配液工序、分装工序、组装工序等，同时对试剂用量、PCR 反应条件等进行研究，还包括对样本用量的研究。

## (三) 分析性能评估

本试剂盒分析性能评估内容主要包括：核酸提取或纯化性能、准确度、精密度、检出限、分析特异性和包容性等。申请人

提交了有效运行的质量管理体系下生产的六批产品在适用机型上的性能评估资料。

### 1.核酸提取或纯化性能

在核酸提取性能研究中，申请人比较评估了不同核酸提取试剂和产品配套使用的核酸提取试剂的提取效果，结果表明配套使用的核酸提取或纯化试剂的核酸提取效果满足本产品使用需求。

### 2.准确度

在准确度的研究中，申请人使用三批试剂，分别检测《猴痘病毒核酸检测试剂国家参考品》中的阳性参考品、阴性参考品、重复性参考品和检出限参考品，结果表明试剂盒检测国家参考品结果均符合要求。

同时，申请人使用三批试剂，分别检测企业阳性参考品、阴性参考品、检出限参考品和精密度参考品，结果表明试剂盒检测企业参考品结果均符合要求。

### 3.精密度

在精密度的研究中，申请人使用六批试剂，分别对强阳性、临界阳性和阴性样本进行 20 天的检测，对批内、批间、日内、日间、操作者间、室内、室间和仪器间精密度进行了评价。结果表明试剂盒检测强阳性、临界阳性样本的批内、批间、日内、日

间、操作者间、室间、室内、仪器间检测结果均为阳性，阳性符合率为 100%，且检测结果 Ct 值的变异系数均不大于 5.0%；检测阴性样本批内、批间、日内、日间、操作者间、室间、室内、仪器间检测结果均为阴性，阴性符合率为 100%。

#### 4. 检出限

在检出限研究中，申请人使用六批试剂，分别检测不同浓度梯度的临床阳性样本，将具有 95% 阳性检出率的最低浓度水平作为确定的检出限，并进行检出限验证。研究结果表明：试剂盒的检出限浓度为 200copies/mL。

#### 5. 分析特异性

在交叉反应研究中，申请人使用三批试剂，分别对浓度均为  $1.0 \times 10^7$  copies/mL 的 31 份特异性样本（天花假病毒、痘苗病毒、牛痘病毒、鼠痘病毒、传染性软疣病毒、特纳河痘假病毒、亚巴猴假病毒、水痘-带状疱疹病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒 I 型、单纯疱疹病毒 II 型、人类疱疹病毒 6 型、人类疱疹病毒 7 型、人类疱疹病毒 8 型、麻疹病毒、肠道病毒 71 型、梅毒螺旋体、登革病毒、金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、绿脓杆菌（铜绿假单胞菌）、白色念珠菌、丙酸杆菌、类白喉杆菌、人乳头瘤病毒、粪肠球菌、棒状杆菌、大肠杆菌、生殖支原体、沙眼衣原体以及浓度为 100ng/ $\mu$ L 的人类基因组 DNA）进行了研究。研究结果

显示上述特异性样本均与试剂盒不产生交叉反应。

在干扰物质研究中，申请人使用三批试剂，分别对样本中可能含有的干扰物质进行评价，包括：外源性干扰物质抗病毒药物（特考韦瑞（100 $\mu$ g/mL）、西多福韦（100 $\mu$ g/mL））；缓解咽部症状的含片、喷剂（桂林西瓜霜喷剂（100 $\mu$ g/mL）、西吡氯铵含片（100 $\mu$ g/mL））；过敏性症状缓解药物（盐酸组胺（100 $\mu$ g/mL）、氯雷他定（100 $\mu$ g/mL）、西替利嗪（100 $\mu$ g/mL））；抗生素（左氧氟沙星（100 $\mu$ g/mL）、阿奇霉素（100 $\mu$ g/mL）、头孢曲松（100 $\mu$ g/mL）、美罗培南（100 $\mu$ g/mL））；解热镇痛药物（扑热息痛（100 $\mu$ g/mL）、对乙酰氨基酚（100 $\mu$ g/mL）、阿司匹林（100 $\mu$ g/mL））；全身性抗菌药物（妥布霉素（100 $\mu$ g/mL））；其他（维生素 A（100 $\mu$ g/mL））以及内源性干扰物质粘蛋白（200mg/dL）、白蛋白（2.26mmol/L）和血液（25%），研究结果显示上述干扰物质对试剂盒的检测结果均无干扰。

## 6. 包容性

在包容性研究中，申请人使用六批试剂，对不同来源的分支 II（Clade II）猴痘病毒临床样本以及分支 I（Clade I）假病毒进行了包容性研究；同时经生物信息学分析 GISAID 数据库中的猴痘序列；结果显示均不会影响本产品的检测。

#### **(四) 阳性判断值或参考区间研究**

申请人采用临床样本，利用 ROC 曲线法以及百分位数法对阳性判断值进行分析确定建立，最终确定本试剂盒的 FAM 通道阳性判断值为 Ct 值等于 40，VIC 通道阳性判断值为 Ct 值等于 36。申请人进一步采用临床样本进行了阳性判断值验证确认。

#### **(五) 稳定性研究**

申请人对本试剂盒的稳定性研究包括实时稳定性、使用稳定性、运输稳定性和样本稳定性。

货架有效期（实时稳定性）研究：采用三批试剂盒保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度条件下，每到一个时间节点取出进行外观、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、重复性、检出限检测，确定试剂盒在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 温度条件下可稳定保存 12 个月。

此外，申请人对本产品的使用稳定性、运输稳定性和样本稳定性进行了研究，结果显示产品的性能均满足产品说明书声称的要求。

### **三、临床评价概述**

申请人在上海市公共卫生临床中心、广东省疾病预防控制中心、四川省疾病预防控制中心和深圳市第三人民医院共四家机构完成了临床试验。临床试验共分为四部分：

第一部分：采用试验用体外诊断试剂与 Sanger 测序进行比较研究试验，验证本产品的临床性能。共纳入样本 911 例，样本共包括 455 例皮肤病变样本和 456 例咽拭子样本。试验结果显示，申报产品与对比试剂对于临床样本检测的阳性符合率 100.00% (95%CI: 98.91%, 100.00%)，阴性符合率 99.11% (95%CI: 97.94%, 99.62%)。针对皮肤病变样本，阳性符合率 100.00% (95%CI: 98.22%, 100.00%)，阴性符合率 99.59% (95%CI: 97.71%, 99.93%)；针对咽拭子样本，阳性符合率 100.00% (95%CI: 97.23%, 100.00%)，阴性符合率 98.75% (95%CI: 96.84%, 99.51%)。

第二部分：采用试验体外诊断试剂与猴痘病毒培养鉴定进行比较研究试验，共纳入 211 例样本，包括 70 例培养鉴定阳性样本、141 例培养鉴定阴性样本。试验结果显示，灵敏度为 100.00% (95%CI: 94.80%, 100.00%)，特异度为 72.34% (95%CI: 64.44%, 79.06%)。

第三部分：采用试验用体外诊断试剂与临床参考标准进行比较研究试验，验证本产品的临床性能。共纳入 643 例受试者，共包括 455 例皮肤病变样本和 456 例咽拭子样本。试验结果显示，申报产品与临床参考标准比较的灵敏度为 97.09% (95%CI: 94.37%, 98.52%)，特异度为 100.00% (95%CI: 98.97%, 100.00%)。

针对皮肤病变样本,灵敏度为 99.07%(95%CI: 96.67%, 99.74%), 特异度为 100.00%(95%CI: 98.42%, 100.00%); 针对咽拭子样本,灵敏度为 88.54%(95%CI: 82.61%, 92.62%), 特异度为 100.00%(95%CI: 98.73%, 100.00%)。

第四部分: 申请人针对 AGS8830-16 和 7500 两种机型进行了一致性比对, 共纳入 911 例样本, 包括皮肤病变样本和咽拭子样本。试验结果显示, 两种机型的阳性符合率 100.00%(95%CI: 98.92%, 100.00%), 阴性符合率 100.00%(95%CI: 99.32%, 100.00%)。

申报产品与对比方法不一致的样本, 均结合临床背景信息和其他检测结果等进行了综合分析。

综上所述, 申报产品的临床试验资料符合技术审评要求。

#### **四、产品受益风险判定**

本试剂盒根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对本产品的安全风险分析方式, 对本试剂盒进行产品受益风险判定。

##### **(一) 受益评估**

本试剂盒用于体外定性检测猴痘疑似病例、其他需要进行猴痘病毒感染诊断或鉴别诊断者的皮肤病变样本(皮疹表面和/或渗出物的拭子)、咽拭子样本中猴痘病毒 F3L 基因。

本产品用于猴痘病毒感染的辅助诊断，本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

## （二）风险评估

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在说明书中提示以下信息：

### 1. 预期用途

本试剂盒用于体外定性检测猴痘疑似病例、其他需要进行猴痘病毒感染诊断或鉴别诊断者的皮肤病变样本（皮疹表面和/或渗出物的拭子）、咽拭子样本中猴痘病毒 F3L 基因。

有关“疑似病例”等人群的定义参照《猴痘诊疗指南》及《猴痘防控技术指南》等文件执行。

本试剂盒在使用上应当遵守《猴痘诊疗指南》及《猴痘防控技术指南》等文件的相关要求。

开展猴痘病毒核酸检测，应符合《猴痘病毒实验室检测技术指南》等的要求，做好生物安全工作。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

## 2. 警示及注意事项

产品说明书中介绍了该产品检验方法的局限性及使用中的注意事项。

## 综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（中华人民共和国国务院令 第 739 号）、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令 第 48 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2024 年 8 月 18 日

附件：产品说明书

## 猴痘病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

### 【产品名称】

通用名称：猴痘病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

### 【包装规格】

大包装，24 人份/盒；

大包装，48 人份/盒。

### 【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测猴痘疑似病例、其他需要进行猴痘病毒感染诊断或鉴别诊断者的皮肤病变样本（皮疹表面和/或渗出物拭子）、咽拭子样本中猴痘病毒 F3L 基因。

有关“疑似病例”等人群的定义参照《猴痘诊疗指南》及《猴痘防控技术指南》等文件执行。

本试剂盒在使用上应当遵守《猴痘诊疗指南》及《猴痘防控技术指南》等文件的相关要求。

开展猴痘病毒核酸检测，应符合《猴痘病毒实验室检测技术指南》等的要求，做好生物安全工作。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

### 【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以猴痘病毒（MPXV）F3L 基因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，用于样本中猴痘病毒 DNA 的定性检测。本试剂盒包括内源性内标（RNase P 基因）检测系统，用于对本标采集、核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控，可减少假阴性结果的出现。本试剂盒同时添加了防污染组分（尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG 酶），其作用机理是选择性水解断裂含有 dU 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。

### 【主要组成成分】

组分名称	规格	数量	主要成分	
PCR 检测试剂 (大包装, 24 人份/盒)	MPXV PCR 反应液 A	510 μL/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	MPXV PCR 反应液 B	105 μL/管	1	热启动 Taq 抗体酶、Taq 酶、dNTPs、UDG 酶
PCR 检测试剂 (大包装, 48 人份/盒)	MPXV PCR 反应液 A	935 μL/管	1	特异性引物、探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	MPXV PCR 反应液 B	195 μL/管	1	热启动 Taq 抗体酶、Taq 酶、dNTPs、UDG 酶
质控品 (适用于大包装, 24 人份/盒; 大包装, 48 人份/盒)	MPXV 阴性质控品	450 μL/管	1	MPXV 内标片段 (RNase P) 的假病毒
	MPXV 阳性质控品	450 μL/管	1	MPXV 目的片段的假病毒、MPXV 内标片段 (RNase P) 的假病毒

备注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

**需自备的试剂：**核酸提取或纯化试剂，使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170583 号、粤穗械备 20170669 号）或使用 QIAGEN 公司生产的 DNeasy Blood & Tissue Kit（Cat.No.69504/69506）。

**需自备的采样液：推荐使用以下采样液：**

(1) 广州达安基因股份有限公司的样本保存液（粤穗械备 20200802 号、粤穗械备 20201254 号），6mL/管；(2) 广州达安基因股份有限公司的一次性使用采样器（粤穗械备 20201915 号），3mL/管；(3) 力因精准医疗产品（上海）有限公司的一次性使用病毒采样试剂盒（备案号：沪松械备 20190075 号），3mL/管；(4) 江苏康健医疗用品有限公司的一次性使用病毒采样管（苏泰械备 20180169 号），3mL/管；(5) 深圳市梓健生物科技有限公司的一次性使用病毒采样管（粤深械备 20190041 号），3mL/管；(6) 四川好培养生物工程有限公司的一次性使用病毒采样管（川蓉械备 20200121 号），3mL/管；(7) 广东牧玛生命科技有限公司的一次性使用病毒采样管（粤莞械备 20200024），3mL/管；(8) 山东享和医疗科技有限公司的一次性使用病毒采样管（鲁菏械备 20200227 号），3mL/管；(9) 江苏默乐生物科技股份有限公司的一次性使用病毒采样管（苏泰械备 20200685 号），6mL/管；(10) 友康恒业生物科技（北京）有限公司的病毒采样试剂盒（京械注准 20182400236），

3.5mL/管；（11）赛默飞世尔科技（中国）有限公司的 RPMI 1640 培养基（货号：11875093），500mL/瓶；（12）生理盐水，即 0.9%的氯化钠水溶液，500mL/瓶。

**质控品说明：**MPXV 阳性质控品为 MPXV 目的片段的假病毒、MPXV 内标片段（RNase P）的假病毒，MPXV 阴性质控品为 MPXV 内标片段（RNase P）的假病毒，使用时均参与提取，不具有生物传染性，但操作时应视为潜在的传染物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

### 【储存条件及有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期 12 个月。

试剂盒应避免反复冻融，反复冻融次数不超过 7 次。

试剂盒生产日期和有效期至见产品标签。

### 【适用仪器】

ABI 7500、AGS8830-16。

### 【样本要求】

1. **适用样本类型：**皮肤病变样本（皮疹表面和/或渗出物拭子）、咽拭子。

2. **样本采集：**

2.1 皮疹表面和/或渗出物拭子采集：

采样时适当用力下压拭子，在皮损表面来回擦拭至少 2-3 次，然后以拭子另一面再重复擦拭 2-3 次。如果在擦拭过程中痘疱破裂，要确保采集到痘疱液。采样后将拭子放置于无菌采样管中（可含病毒采样液或不含液体），折断拭子头，去除拭子尾部，盖上管盖，以消毒纸巾擦拭消毒采样管，以封口膜密封管盖后将采样管保存或送检。

2.2 咽拭子采集：

用拭子在被采集者两侧扁桃体稍微用力来回擦拭至少 3 次，然后再在咽后壁上下擦拭至少 3 次，将拭子头浸入含病毒保存液的管中或置于不含液体（干拭子）的无菌管中，尾部弃去，旋紧管盖。

3. **样本保存**

所采集的样本应尽快进行检测，或置于-20±5℃保存期为 6 个月，-70℃或以下环境长期保存，样本应避免反复冻融，冻融次数不可超过 7 次。

### 【检验方法】

1. **样本处理和核酸提取（样本处理区）**

使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170583 号）或使用 QIAGEN 公司生产的 DNeasy Blood & Tissue Kit（Cat.No.69504/69506）取 200μL 样本进行核酸提取，洗脱体积 100μL；或使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170669 号）取 200μL 样本进行核酸提取，洗脱体积 50μL。

本试剂盒中的 MPXV 阴性质控品、MPXV 阳性质控品均参与提取。

2. **PCR 试剂准备（试剂准备区）**

从试剂盒中取出 MPXV PCR 反应液 A、MPXV PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，瞬时离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+MPXV 阴性质控品+ MPXV 阳性质控品）PCR 反应管

MPXV 单人份扩增体系配制如下表：

MPXV PCR 反应液 A	MPXV PCR 反应液 B	扩增体系
17μL	3μL	20μL

将各组充分混合后进行短时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 20μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

3. **加样（样本制备区）**

往上述对应的 PCR 反应管中分别加入处理后的 MPXV 阴性质控品、待测样本核酸、MPXV 阳性质控品各 10μL，盖紧管盖。瞬时离心 15 秒后转移至扩增检测区。

4. **PCR 扩增（扩增检测区）**

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 **ABI 7500 仪器设置**

4.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控品（NTC）、阳性质控品以及未知样本（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter 1: FAM, Quencher 1: NONE; Reporter 2: VIC, Quencher

2: NONE; Passive Reference: NONE。

4.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

Stage	Reps	Target (°C)	Running Time	Data Collection
1	1	50	00: 02: 00	
2	1	95	00: 05: 00	
3	45	95	00: 00: 05	
		60	00: 00: 35	√

设置完成后，保存文件，运行程序。

#### 4.3 AGS8830-16 仪器设置

4.3.1 打开AGS8830-16仪器。

4.3.2 点击自定义，设置程序。

4.3.3 程序参数：在程序参数页面。扩增参数如下：

程序段	循环数	目标温度 (°C)	恒温时间	读取荧光
1	1	50	00: 02: 00	
2	1	95	00: 05: 00	
3	45	95	00: 00: 05	
		60	00: 00: 10	√

4.3.4 染料参数：点击染料参数页面，在选择当前程序染料设置（通道1 FAM，通道2 VIC），然后选定样品孔；并在样本类型部分选择：阴性质控品、阳性质控品、未知样品等。

4.3.5 启动扩增：确认PCR反应管在主机内放置妥当后，点击开始按钮开始PCR循环。

4.3.6 监控进程：切换程序运行页面，可以实时显示PCR曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果标记物选FAM、VIC，只显示对应探针的变化情况。

4.3.7 保存结果：程序结束后，自动保存到文件路径。

#### 5. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期），点击 Analysis 自动获得分析结果，在“Report”窗口读取检测结果。

#### 6. 质量控制

MPXV 阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线或 Ct 值 >40，VIC 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值 ≤35；

MPXV 阳性质控品：FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值 ≤32，VIC 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值 ≤35；

以上要求需在同一实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

#### 【阳性判断值】

根据临床样本检测结果，最终确定本试剂盒的目标基因阳性判断值为 Ct 值=40；内标阳性判断值为 Ct 值=36。

#### 【检验结果的解释】

1. 每次实验均需检测 MPXV 阴性质控品、MPXV 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. 在质控品正常的情况下，结果判读如下：

阴性结果判定：若检测样品的 FAM 检测通道无扩增曲线，且 VIC 通道有扩增曲线，Ct 值 ≤36，可判样品为 MPXV 阴性；

	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
阴性结果判定	Ct 值 >40，或无 Ct 值	Ct 值 ≤36 值	阴性

阳性结果判定：若检测样品的 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 ≤40，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为 MPXV 阳性。

	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
阳性结果判定	Ct 值 ≤40	有或无扩增曲线	阳性

3. FAM 检测通道为阳性时，由于体系的竞争关系，VIC 通道（内标通道）结果可能为阴性；

4. 内标结果为阴性时，若该检测管的 FAM 检测通道也为阴性，可能是因为体系受抑制或操作失误，试验无效，需对该样品进行复检；

#### 5. 报告建议采用以下格式:

阴性结果报告格式为: 样本未检测到猴痘病毒 DNA, 或样本浓度低于本试剂盒的灵敏度;  
阳性结果报告格式为: 样本检测到猴痘病毒 DNA。

#### 【检测方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关, 不合理的样本采集、转运、储存及处理以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致错误的检测结果。
2. 如果样本在运输、处理过程中发生交叉污染, 则可能导致假阳性结果。
3. 实验室环境有PCR产品等气溶胶污染, 则可能导致假阳性结果。
4. 实验过程中使用耗材、设备等受污染, 则可能导致假阳性结果。
5. 不合理的样本采集、转运、储存及处理、样本中病原体含量过低均有可能导致假阴性结果。
6. 该病原体待测靶序列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。
7. 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。
8. 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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

#### 【产品性能指标】

1. 本试剂盒的最低检出限为 200copies/mL, 检测试剂盒靶区范围内的国家检出限参考品, 浓度不低于声称检出限水平的稀释度检测结果为阳性。
2. 阴阳性参考品符合率: 企业阳性参考品符合率为 100%; 检测国家阳性参考品 (P1~P3), P1 检测结果为阳性, P2、P3 检测结果为阴性; 企业阴性参考品符合率为 100%; 检测国家阴性参考品 (N1~N10), N1~N10 结果均为阴性。
3. 企业精密度参考品 R1、R2 检测结果均为阳性, 且 FAM 通道 Ct 值的变异系数均不高于 5.0%, R3 检测结果为阴性; 检测试剂盒靶区范围内的国家重复性参考品, 10 次检测结果均为阳性, 且 FAM 通道 Ct 值的变异系数 (CV, %) 不高于 5.0%。
4. 交叉反应: 与猴痘病毒种属相近、引起症状相似或可能共同感染的其他病原体 (浓度均为  $1.0 \times 10^7$  copies/mL), 包括天花假病毒、痘苗病毒、牛痘病毒、鼠痘病毒、传染性软疣病毒、特纳河痘假病毒、亚巴猴假病毒、水痘-带状疱疹病毒、风疹病毒、单纯疱疹病毒 I 型、单纯疱疹病毒 II 型、人类疱疹病毒 6 型、人类疱疹病毒 7 型、人类疱疹病毒 8 型、麻疹病毒、肠道病毒 71 型、梅毒螺旋体、登革病毒、金黄色葡萄球菌、化脓性链球菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、丙酸杆菌、类白喉杆菌、人乳头瘤病毒、粪肠球菌、棒状杆菌、大肠杆菌、生殖支原体、沙眼衣原体以及高浓度人类基因组 DNA (100ng/μL) 无交叉反应。
5. 外源性干扰物质: 样本中存在治疗药物, 如抗病毒药物 (特考韦瑞 (100μg/mL)、西多福韦 (100μg/mL))、缓解咽部症状的含片、喷剂 (桂林西瓜霜喷剂 (100μg/mL)、西吡氯铵含片 (100μg/mL))、过敏性症状缓解药物 (盐酸组胺 (100μg/mL)、氯雷他定 (100μg/mL)、西替利嗪 (100μg/mL))、抗生素 (左氧氟沙星 (100μg/mL)、阿奇霉素 (100μg/mL)、头孢曲松 (100μg/mL)、美罗培南 (100μg/mL))、解热镇痛药物 (扑热息痛 (100μg/mL)、对乙酰氨基酚 (100μg/mL)、阿司匹林 (100μg/mL))、全身性抗菌药物 (妥布霉素 (100μg/mL))、维生素 A (100μg/mL) 对试剂盒的检测结果无干扰。
6. 内源性干扰物质: 样本中可能存在的内源性物质如粘蛋白 (200mg/dL)、白蛋白 (2.26mmol/L)、血液 (25%) 对试剂盒的检测结果无干扰。
7. 包容性: 对不同来源的分支 II (Clade II) 猴痘病毒临床样本以及分支 I (Clade I) 假病毒进行了包容性研究; 同时, 经生物信息学分析 GISAID 数据库中的猴痘序列; 结果显示均不会影响本产品的检测。
8. 临床评价: 在 4 家临床中心完成 643 名受试者 911 例样本的临床试验。与对比方法 (Sanger 测序法) 相比: 阳性符合率为 100.00%, 阴性符合率为 99.11%; 与猴痘病毒培养鉴定比较, 灵敏度为 100%, 特异度为 72.34%; 与临床参考标准比较, 灵敏度为 97.09%, 特异度为 100%。

#### 【注意事项】

1. 本产品仅用于体外检测, 实验前请仔细阅读本说明书;
2. 为了避免样本中任何潜在的生物危险, 检测样本应视为具有传染性物质, 避免接触到皮肤和粘膜; 样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作, 样本制备区所用过的试管、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; 样本操作和处理均需符合相关法规要求: 包括卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》;
3. 产物处理: PCR 结束之后, 产物容易引起污染, 应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃

圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃；

4. 实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道；
5. 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头；
6. PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融；
7. 如果在样本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性；
8. 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、样本制备区、扩增检测区），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；
9. 实验完毕用 10% 次氯酸或 75% 酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20-30 分钟；
10. 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验；
11. 须对每次实验进行质量控制。

#### 【参考文献】

1. Arita I, Jezek Z, Khodakevich L, et al. Human monkeypox: a newly emerged orthopoxvirus zoonosis in the tropical rain forests of Africa[J]. Am J Trop Med Hyg. 1985;34(4): 781-789.
2. 管茜茜,田厚文.猴痘病毒检测研究进展[J].中华实验和临床病毒学杂志,2017,31(3):273-276.

#### 【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：

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：

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 号

#### 【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

#### 【说明书批准日期/生效日期及修改日期】