

受理号：CSZ1900160

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：结核分枝杆菌复合群核酸检测

试剂盒（恒温扩增-实时荧光法）

产品管理类别：第三类（6840）

申请人名称：杭州优思达生物技术有限公司

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
产品审评摘要	4
一、 产品概述	4
二、 临床前研究摘要	6
三、 临床评价摘要	11
四、 风险分析及说明书提示	16
综合评价意见	18

基本信息

一、申请人名称

杭州优思达生物技术有限公司

二、申请人住所

浙江省杭州市滨江区南环路3766号801-808室

三、生产地址

杭州市滨江区长河街道秋溢路399号C幢一、二层，A幢五层

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒含有MTC-全自动检测管、MTC-内标、MTC-DNA提取液、MTC-阳性对照、MTC-阴性对照，主要组成成分见表1。

表 1 试剂盒主要组成成分

序号	组分名称	规格	数量	主要成分
1	MTC-全自动检测管	1 测试/支	20 支	含有一定浓度的 Tris、MgSO ₄ 、结核分枝杆菌特异性引物和探针、内标特异性引物和探针、脱氧核糖核苷三磷酸 (dNTP)、DNA 聚合酶
2	MTC-内标	1 测试/管	20 管	枯草芽孢杆菌细胞
3	MTC-DNA 提取液	1ml/测试/管	20 管	胍盐、磁珠
4	MTC-阳性对照	100 μl/管	1 管	含有结核分枝杆菌特异性片段的质粒
5	MTC-阴性对照	100 μl/管	1 管	蒸馏水

(二) 产品预期用途

本试剂盒适用于体外定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌复合群 (MTC) 脱氧核糖核酸 (DNA)。

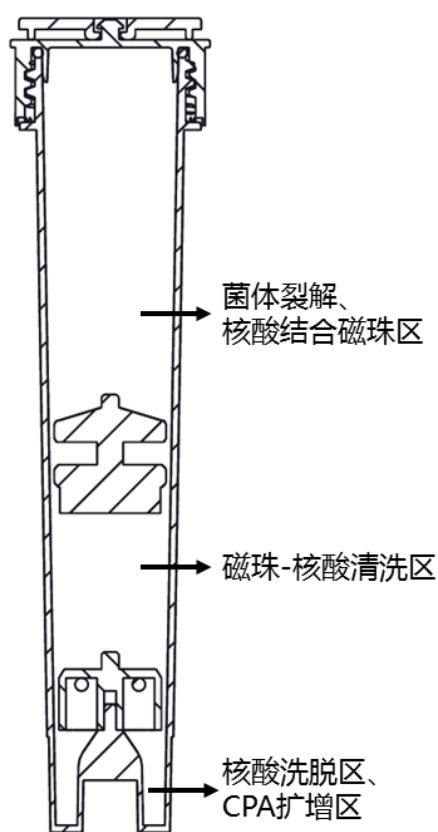
(三) 产品包装规格

20测试/盒, 货号: 20103

(四) 产品检验原理

本试剂盒中的全自动检测管在管内设置多个疏水分隔层, 将管内

的裂解液、清洗液和反应液进行隔离。通过外部仪器的加热控制，提取液在高温下化学裂解检测样本并释放出核酸。通过外部仪器磁导作用，使得检测用的标本核酸分别穿过不同液体层，最后核酸在管腿中被洗脱下来，发生扩增反应，从而实现“一管式”的全自动核酸分析即在一个密闭检测管内完成裂解结合、清洗、洗脱和扩增反应。



本试剂盒采用交叉引物恒温扩增技术（Crossing Priming Amplification, CPA）检测结核分枝杆菌复合群特异性的IS6110插入序列。其反应体系通过6条特异性扩增引物、1条特异性荧光探针以及具有高活性的链置换特性的DNA聚合酶，在恒定温度条件下，一次性完成结核分枝杆菌复合群

IS6110片段的特异扩增过程，荧光信号被适配仪器探测到并自动生成实时荧光曲线。

本试剂盒预装的试剂还包括内标（简称IC），由内标模板（干燥后附着于离心管底的非传染性细胞，即MTC-内标）和一套与其对应的CPA系统（含5条引物和1条特异性荧光探针）组成，用以监测提取、纯化和扩增反应是否有效。

上机前，用户只需加入MTC-DNA提取液、MTC-内标和待测样本，在适用仪器控制下就能自动完成样本中DNA的提纯，提纯后的DNA与

CPA反应试剂被适用仪器混匀加热后进行恒温扩增，同时，荧光探针与引物扩增区域中的一段DNA模板发生特异性结合并扩增而产生荧光信号。适用仪器实时采集荧光信号并通过对荧光信号变化的分析实现自动判定检验结果。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

本产品的主要原材料包括：引物、探针、DNA聚合酶、dNTPs、磁珠、MTC-内标。引物和探针由申请人设计，由专业的合成公司合成。其他主要原材料均购自外部供应商。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，并制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

试剂盒在企业内部产品放行之前使用企业参考品进行最终放行检测。企业参考品包括企业阴性参考品（2份）、企业阳性参考品（2份）、企业最低检测限参考品（4份）以及企业重复性参考品（10份）。企业阴性参考品分别为灭活的耻垢分枝杆菌和海分枝杆菌培养菌液，对试剂盒的特异性进行质控；企业阳性参考品分别为灭活的H37Rv培养菌液和灭活的卡介苗培养菌液，使用时稀释至指定浓度后再进行确认检测，试剂盒检测结果符合质控标准后方可放行使用。企业最低检测限参考品为经国家参考品标化的不同浓度的灭活卡介苗培养菌液。企业重复性参考品为经国家参考品标化的灭活卡介苗培养菌液。

本试剂盒包括内部质控和外部质控。

内部质控即内标系统由内标模板（干燥后附着于离心管底的非传染性细胞）和一套与其对应的 CPA 系统（含 5 条引物和 1 条特异性荧光探针）组成，用以监测是否发生样本处理失败、扩增试剂失效或适用仪器故障。

外部质控包括MTC-阳性对照和MTC-阴性对照。MTC-阳性对照是含有一定浓度的结核分枝杆菌复合群特异性片段的人工构建质粒溶液，用于排除扩增试剂失效或适用仪器故障；MTC-阴性对照是蒸馏水，用于监测试剂或环境是否被污染。外部质控仅用于排除故障和实验室质量控制。

（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。

申请人对核酸提取/纯化组分、清洗液、裂解体系、洗脱复溶液及反应体系中的引物和探针浓度、DNA聚合酶种类和浓度、dNTP 浓度、磁珠的种类和浓度和MTC-内标系统等进行筛选和优化，通过企业参考品或国家参考品进行功能性实验或验证，最终确定了最佳反应体系。

（三）分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括：最低检测量（分析灵敏度）试验、分析特异性研究（交叉反应和干扰试验）、重复性研究、包容性研究、准确度研究、核酸提取性能研究等。

在最低检测量（分析灵敏度）研究中，申请人采用三批成品试

试剂盒检测添加特定浓度结核分枝杆菌和牛结核分枝杆菌菌液的临床阴性痰样本，最终确定并验证了本产品对痰样本的最低检测限为100个菌/测试。

在交叉反应研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对常见的呼吸道病原体及易产生交叉反应的病原体进行了研究，包括20种非结核分枝杆菌复合群的其他分枝杆菌以及其他16种病原体。

表2用于交叉反应研究的非结核分枝杆菌

名称	测试浓度	测试结果
堪萨斯分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
海分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
土地分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
次要分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
溃疡分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
戈登分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
蟾蜍分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
鸟分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
瘰癧分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
亚洲分枝杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
苏加分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
龟分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
偶发分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
耻垢分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
脓肿分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
胃分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
胞内分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
草分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
施氏分枝杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
龟脓分枝杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性

本试剂盒检测呼吸道常见病原体（见表3）的检测结果均为阴性，无交叉反应。

表3用于交叉反应研究的呼吸道常见病原体

名称	测试浓度	测试结果
肺炎链球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
流感嗜血杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
大肠杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
表皮葡萄球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
隐球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
人流感病毒（A型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人流感病毒（B型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人类副流感病毒（1型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人类副流感病毒（2型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人类副流感病毒（3型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
金黄色葡萄球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
诺卡氏菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
绿脓杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
白色念珠菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
百日咳杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
嗜肺军团菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
北京棒杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性

本产品对上述36种病原体的检测结果均为阴性，无交叉反应。

在干扰试验研究中，申请人对常用外源性药物（见表4）在药代动力学峰值浓度范围内对本试剂盒的检测结果显示不产生干扰。其他干扰物质未进行研究，其影响不详。

表4用于干扰研究的外源性药物

名称	测试浓度	检测结果
利福平	25 μg/ml	合格
链霉素	50 μg/ml	合格
乙胺丁醇	5 μg/ml	合格
异烟肼	6 μg/ml	合格
吡嗪酰胺	50 μg/ml	合格
左氧氟沙星	17 μg/ml	合格

羟甲唑啉	0.5mg/ml	合格
莫匹罗星	5mg/测试	合格
卡那霉素	35 μg/ml	合格
扎那米韦	142ng/ml	合格
地塞米松	5mg/ml	合格

结果显示：以上外源性药物在药代动力学峰值浓度范围内对本试剂盒的检测结果不产生干扰。对内源性干扰物血液（200 μl/测试）和黏蛋白（50 μg/测试）进行研究，结果显示：低于上述浓度的干扰物质不会对本产品的检测结果产生干扰。

在重复性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，检测国家参考品的精密度参考品、阴性样本（不含结核分枝杆菌）、弱阳性样本（浓度为 10^2 个菌/测试的卡介苗培养菌液）和中等阳性样本（浓度为 333 个菌/测试的卡介苗培养菌液），分别评估了批内/批间、日间以及不同操作者之间的精密度。结果显示：Tt 值的 CV 值均小于 15%，表明本产品的批内/批间、日间以及不同操作者间的重复性均较好。

在包容性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，检测结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌。结果显示：本产品对 10^2 个菌/测试浓度的结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌均能 100% 检出。

在准确度评估（方法学对比）研究中，申请人采用本产品与已上市同类 PCR 产品比较研究的方法，共同检测临床样本 192 例，结果显示：

两种产品准确度一致性Kappa值为0.84，说明两种产品具有很好的一致性。

在核酸提取性能研究中，申请人研究了核酸提取的提取效率和抗干扰能力测试，结果显示：试剂盒核酸提取效率受外源药物和内源干扰物的影响不显著。提取的核酸的检测性能均满足要求。

（四）阳性判断值

申请人采用ROC曲线法确定阳性判断值。申请人采用本产品对159例临床痰液样本（82例非肺结核患者样本，77例肺结核患者样本）进行检测，结果显示：当MTC阈值时间（简称Tt）为40时，本产品的灵敏度和特异性达到最佳。所以确定本产品的阳性判断值为40（当 $Tt \leq 40$ 时为MTC阳性；当 $Tt > 40$ 时为MTC阴性）。申请人采用申报产品对33例临床临界阳性痰液样本进行阳性判断值的验证，结果显示：采用确定的阳性判断值对结果进行判定时，检测结果与对比PCR试剂盒的检测结果一致性为100%，通过临床痰液样本建立的阳性判断值合理。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、运输稳定性和使用稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。同时，对痰液样本的常温放置稳定性、冷藏稳定性、冷冻稳定性和冻融稳定性进行了研究，确定了临床样本的有效保存时间。

三、临床评价摘要

申请人在首都医科大学附属北京胸科医院、武汉市传染病医

院、湖南省胸科医院进行了临床试验。采用申报产品与对照试剂对临床样本进行比较研究，验证本产品的临床性能。对比试剂选择已上市同类产品（注册证号：国械注准20173400166）若出现两者检测结果不一致的情况，采用复核试剂盒进行复核。

本次临床试验入组病例样本共612例，其中，有12例方案偏离/违背的病例样本，包括5例样本重复入组，7例样本不满足入选标准或者符合排除标准，不纳入统计分析；有8例样本在检测过程中出现操作失误或其他差错，导致检测结果缺失，根据剔除标准予以剔除，也不纳入统计分析。最终合格病例样本共592例，样本类型均为痰液。

在592例合格病例样本中，临床诊断为肺结核的患者有386例，其中涂片阴性的肺结核患者有193例，涂片阳性的肺结核患者有193例；非肺结核的其他呼吸道疾病患者与易混淆疾病（如上呼吸道感染、肺炎、气管炎、支气管炎、慢性支气管炎、肺部感染、支气管扩张、肺癌、胸膜炎、肺脓肿、肺吸虫、尘肺等）样本有191例；疑似肺结核15例。

在592例合格病例样本中，男性435人，女性157人。平均年龄 52 ± 17.32 岁，最小年龄4岁，最大年龄93岁。

待考评试剂盒与对照试剂盒、痰涂片镜检法和培养鉴定法的准确性分析比较结果汇总如下：

(1) 与对照试剂盒检测结果一致性分析：本次临床试验合格病例样本共592例，经待考评试剂盒检测，阳性255例，阴性337例；

经对照试剂盒检测，阳性264例，阴性328例。将每例样本的待考评试剂盒检测结果与对照试剂盒检测结果进行一致性分析，结果显示，待考评试剂盒的阳性符合率为96.21%，95%CI (0.93, 0.98)；阴性符合率为99.70%，95%CI (0.98, 1.00)；总符合率为98.14%，95%CI (0.97, 0.99)；Kappa值为0.96， $P < 0.001$ ，总体一致性好。

(2) 与痰涂片镜检法检测结果一致性分析：本次临床试验有效肺结核患者的痰涂片剩余样本共280例，将待考评试剂盒检测结果与痰涂片镜检检测结果进行一致性分析，结果表明，待考评试剂盒对涂片阳性的肺结核患者的检出率为97.89%，对涂片阴性的肺结核患者的检出率为26.81%。

(3) 与培养鉴定法检测结果一致性分析：本次临床试验选择104例肺结核患者痰液样本进行待考评试剂盒与培养鉴定法的对照研究，其中涂片阴性痰液样本53例，涂片阳性痰液样本51例，样本均为痰培养鉴定剩余样本。待考评试剂盒检测结果为阳性的有56例，阴性的有48例；培养鉴定结果为结核分枝杆菌阳性的有45例，结核分枝杆菌阴性的有59例。将每例样本的待考评试剂盒检测结果与培养鉴定法检测结果进行一致性分析，结果表明，待考评试剂盒阳性符合率为91.11%，95%CI (0.79, 0.96)；阴性符合率为74.58%，95%CI (0.62, 0.84)；总符合率为81.73%，95%CI (0.73, 0.88)；Kappa值为0.64， $P < 0.001$ ，总体一致性良好。

(4) 与病人最终临床诊断结果一致性分析：本次临床试验共进行了577例待考评试剂盒与最终临床诊断结果的对照研究，其中

最终临床诊断为肺结核的有386例，非肺结核的有191例，样本均为临床痰液剩余样本。待考核试剂盒检测结果为阳性的有251例，阴性的有326例。将每例样本的待考评试剂盒检测结果与培养鉴定法检测结果进行一致性分析，结果表明，待考评试剂盒阳性符合率为60.10%，95%CI (0.55, 0.65)；阴性符合率为90.05%，95%CI (0.85, 0.94)；总符合率为70.02%，95%CI (0.66, 0.74)；Kappa值为0.43， $P < 0.001$ ，总体一致性一般。

待考评试剂盒与对照试剂盒、痰涂片镜检法和培养鉴定法检测结果不一致分析结果汇总如下：

(1) 与对照试剂盒检测结果不一致性分析：在592例合格病例样本中，共出现11例待考评试剂盒与对照试剂盒检测结果不一致样本，不一致样本用复核试剂盒进行复核。其中有4例经临床诊断为肺结核病例，待考评试剂盒检测结果均为阴性，对照试剂盒和复核试剂盒检测结果均为阳性；有4例经临床诊断为肺结核病例，待考评试剂盒和复核试剂盒检测结果均为阴性，对照试剂盒检测结果为阳性。可能导致的原因：痰液样本中菌浓度偏低，导致分样时各管取样的菌量有随机误差。有2例经临床诊断为非肺结核的其他呼吸道疾病与易混淆疾病，待考评试剂盒和复核试剂盒检测结果均为阴性，对照试剂盒检测结果为阳性；有1例经临床诊断为非肺结核的其他呼吸道疾病与易混淆疾病，待考评试剂盒和复核试剂盒检测结果均为阳性，对照试剂盒检测结果为阴性。

(2) 与痰涂片镜检结果不一致性分析：在280例肺结核患者的

痰涂片剩余样本中，共出现40例待考评试剂盒与痰涂片镜检结果不一致样本。其中待考评试剂盒检测结果为阳性而痰涂片镜检结果为阴性的有37例，待考评试剂盒检测结果为阴性而痰涂片镜检结果为阳性的有3例，此40例样本待考评试剂盒与对照试剂盒的检测结果则完全一致。可能导致的原因：一是分子诊断比痰涂片镜检具有较高灵敏度；二是痰涂片镜检只能检测分枝杆菌属级别，但不能区分MTC与非结核分枝杆菌（NTM），而分子诊断方法能特异检出MTC，但不检出NTM。

（3）与培养鉴定法检测结果不一致性分析：在104例肺结核患者的痰培养鉴定剩余样本中，共出现19例待考评试剂盒与培养鉴定法检测结果不一致样本。其中待考评试剂盒检测结果为阳性而培养鉴定结果为结核分枝杆菌阴性的有15例，待考评试剂盒检测结果为阴性而培养鉴定结果为结核分枝杆菌阳性的有4例。此19例样本待考评试剂盒与对照试剂盒的检测结果则完全一致。

（4）与病人最终临床诊断结果一致性分析：本次临床试验选择577例肺结核患者痰液样本进行待考核试剂盒与最终临床诊断的对照研究，待考评试剂盒检测结果为阳性而最终临床诊断为非肺结核或易混淆的有19例，其中18例待考评试剂盒与对照试剂盒的检测结果则完全一致，这些病患有可能存在混合感染。待考评试剂盒检测结果为阴性而最终临床诊断为结核的有154例。其中146例待考评试剂盒与对照试剂盒的检测结果则完全一致，这些病患有可能未排菌或者排菌浓度低于最低检测限。

可靠性分析结果显示，本次临床试验合格病例样本共592例，待考评试剂盒检测结果为“无效”出现0次，待考评试剂盒可靠性很好。

本次临床试验结果表明，申报产品与对照试剂盒检测性能结果、培养鉴定方法评价结果及对涂片阳性和阴性的肺结核患者的检出率均满足《结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂注册技术审查指导原则》的要求。

四、风险分析及说明书提示

参照“YY/T0316-2016医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对本产品进行风险分析。经综合评价，本产品的受益和风险总结如下：

本产品检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本处理等因素影响，同时也受到实验操作、实验环境等限制，导致可能得出假阳性或假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。

本产品用于体外定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌复合群（MTC）脱氧核糖核酸（DNA）。不合理的样本收集、样本前处理、样本运送、样本保存以及检验操作，会导致假阳性或假阴性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作。

本产品阴性结果仅说明提取的核酸浓度低于本试剂盒的检测限，但不能完全排除结核分枝杆菌感染的可能。当痰标本的结核

分枝杆菌总含量低于100个菌/测试时，可能会出现假阴性。

本产品在检测过程中涉及基因扩增，在非可控的实验室操作可能由于环境中气溶胶的存在导致结果不可靠，同时扩增反应过程中气溶胶的泄露可能会导致设备甚至实验室的污染。因此，实验室应按照国家规定进行相应实验室质量控制，以避免因实验室污染造成的试剂盒检测假阳性的结果。检验人员使用的防护设施，如手套、实验服等，应分区管理，避免引入污染，导致检测结果出错。

通过环境控制、生产监控、成品检验和增加说明书警示内容等防范措施，对该产品的已知和可预见的安全风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在验收准则规定的可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险。在目前认知水平上，认为该产品上市带来的获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以下信息：

1. 适用范围：用于体外定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌复合群（MTC）脱氧核糖核酸（DNA）。
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，属于优先审批项目（编号：20190015）。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》（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。

2019年12月13日

附件：产品说明书

附件

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒 (恒温扩增-实时荧光法) 说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（恒温扩增-实时荧光法）

【包装规格】

20测试/盒，货号：20103

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测人痰液样本中的结核分枝杆菌复合群（MTC）脱氧核糖核酸（DNA）。

结核病是由结核分枝杆菌复合群（即 MTC，包括结核分枝杆菌、牛分枝杆菌、田鼠分枝杆菌和非洲分枝杆菌等¹）引起的慢性传染性疾病，可累及全身各个器官，以肺结核最为多见。结核分枝杆菌主要是经空气传播，潜伏感染时间长。据世界卫生组织 (WHO)2018 年全球结核病报告²，2017 年约有 1000 万结核新病例。WHO 已将结核病作为重点控制的传染病之一。

结核病的诊断需要结合患者症状、体征、影像学检查结果，以及其他多种辅助诊断方法进行综合判断³。现应用于肺结核病诊断的实验室检查方法有：细菌学检查、分子生物学检查、结核病病理学检查、免疫学检查⁴。

【主要组成成分】

本试剂盒主要由表 1 中组分组成：

表 1 主要组成成分

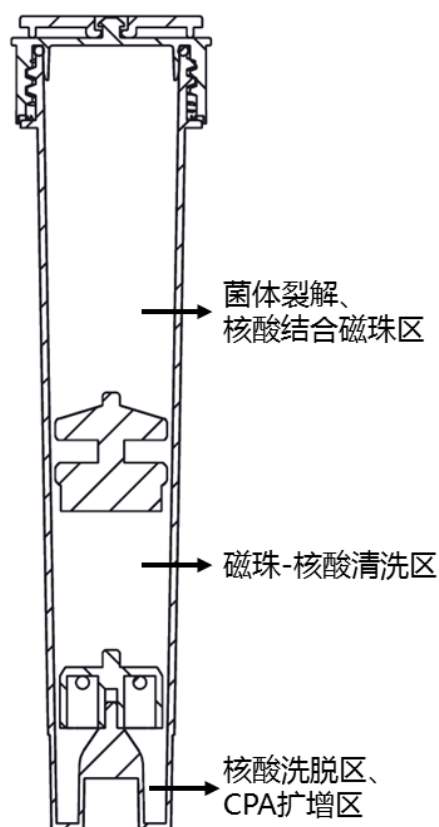
序号	组分名称	规格	数量	主要成分
1	MTC-全自动检测管	1 测试/支	20 支	含有一定浓度的 Tris、MgSO ₄ 、结核分枝杆菌特异性引物和探针、内标特异性引物和探针、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、DNA 聚合酶
2	MTC-内标	1 测试/管	20 管	枯草芽孢杆菌细胞
3	MTC-DNA 提取液	1ml/测试/管	20 管	胍盐、磁珠
4	MTC-阳性对照	100μl/管	1 管	含有结核分枝杆菌特异性片段的质粒

5	MTC-阴性对照	100 μ l/管	1 管	蒸馏水
---	----------	---------------	-----	-----

注意：

1. 不同批号试剂盒中各组分不能互换混用。
2. 用户自备：4%NaOH 溶液、1.5ml 离心管。

【检验原理】



本试剂盒中的全自动检测管在管内设置多个疏水分隔层，将管内的裂解液、清洗液和反应液进行隔离。通过外部仪器的加热控制，提取液在高温下化学裂解检测样本并释放出核酸。通过外部仪器磁导作用，使得检测用的标本核酸分别穿过不同液体层，最后核酸在管腿中被洗脱下来，发生扩增反应，从而实现“一管式”的全自动核酸分析即在一个密闭检测管内完成裂解结合、清洗、洗脱和扩增反应。

本试剂盒采用交叉引物恒温扩增技术（Crossing Priming Amplification, CPA⁵）检测结核分枝杆菌复合群特异性的 IS6110 插入序列。其反应体系通过 6 条特异性扩增引物、1 条特异性荧光探针以及具有高活性的链置换特性的 DNA 聚合酶，在恒定温度条件下，一次性完成结核分枝杆菌复合群 IS6110 片段的特

异扩增过程，荧光信号被适配仪器检测到并自动生成实时荧光曲线。

本试剂盒预装的试剂还包括内标(简称 IC)，由内标模板（干燥后附着于离心管底的非传染性细胞，即 MTC-内标）和一套与其对应的 CPA 系统（含 5 条引物和 1 条特异性荧光探针）组成，用以监测提取、纯化和扩增反应是否有效。

上机前，用户只需加入 MTC-DNA 提取液、MTC-内标和待测样本，在适用仪器控制下就能自动完成样本中 DNA 的提纯，提纯后的 DNA 与 CPA 反应试剂被适用仪器混匀加热后进行恒温扩增，同时，荧光探针与引物扩增区域中的一段 DNA 模板发生特异性结合并扩增而产生荧光信号。适用仪器实时采集荧光信号并通过对荧光信号变化的分析实现自动判定检验结果。

【储存条件及有效期】

于 2℃-8℃ 保存，有效期为 9 个月，生产日期及失效日期见标签。

将 MTC2.0 试剂盒正面朝上放入 AB 瓦楞纸箱中，四周空隙填充缓冲物，用封口胶带封口，外包装箱贴上正放标识。7 天内常温（-25℃至 30℃）运输不会影响产品性能。

【样本要求】⁶

1. 样本收集：收集不少于 1.5ml 疑似肺结核患者痰液样本（痰标本）于痰液前处理管中。
若样本中唾液占绝大部分，则需重新采集样本。
2. 样本前处理：
 - 2.1 将痰标本置于痰液前处理管中，视痰标本粘稠度在其中加入 2-4 倍体积 4%NaOH 溶液，旋紧盖子后涡旋振荡 30 秒，使标本均质化。
 - 2.2 室温放置 15 分钟，待标本充分液化（无明显固状物，且吸出时无拖丝现象）。
 - 2.3 取 1ml 液化好的痰标本加入至 1.5ml 离心管中，12000rpm 离心 3 分钟，弃去上清。
3. 样本运送：按照《结核病实验室检验规程》⁶（中国防痨协会编著）推荐的方法运送样本。
4. 样本保存：收集痰标本后应尽快送检，如果不能立即送检，应将标本置于 2℃至 8℃冷藏（不超过 7 天）；实验室收到标本后，应尽快完成检验。痰标本可在-15℃至-25℃保存 1 个月。

【适用仪器】

杭州优思达生物技术有限公司生产的核酸扩增检测分析仪（型号：UC0102）。

【检验方法】

按本说明书要求进行检验操作。

1. 痰标本的检验

1.1 准备检测管

1.1.1 充分混匀 MTC-DNA 提取液至管底无可见棕色沉淀物且管中无可见块状物。

1.1.2 将 MTC-DNA 提取液全部转入 MTC-内标管中，静置 10-20 秒后，充分混匀至管底无可见紫色附着物。

1.1.3 将步骤 1.1.2 得到的混合液全部转入已弃上清的痰标本离心管中（详见【样本要求】2），充分混匀至管底无可见附着物。

1.1.4 将步骤 1.1.3 得到的混合液全部转入 MTC-全自动检测管中，盖好管盖。

1.2 进行检测

重要提示：本节列出了运行检测的基本步骤，详细说明请参见适用仪器的说明书。

1.2.1 录入检测管信息：将按照【检验方法】1.1 准备好的检测管的二维码（位于检测管的盖子上方）对着适用仪器的扫描区，系统将自动录入检测管信息和扩增检测所用程序 MTC00。如无法自动录入，也可以通过点击适用仪器触摸屏上的【扫描检测管二维码】按钮手动录入。

1.2.2 录入样本信息：将步骤 1.2.1 中检测管对应样本信息的条形码对着适用仪器的扫描区，系统将自动录入样本信息。如无法自动录入，也可以通过点击适用仪器触摸屏上的【扫描样本条形码】按钮手动录入。

1.2.3 开始检测：将检测管放入适用仪器的样本室中，盖上样本室的盖子，点击适用仪器触摸屏上的【开始】按钮，仪器开始运行检测程序。

1.3 检验结果

检测程序运行结束后自动显示并保存检验结果。具体可参见【检验结果的解释】。

2. 外部质控的检验

2.1 充分混匀 MTC-DNA 提取液，将其全部转入 MTC-内标管中，静置 10-20 秒后充分混匀至管底无可见紫色附着物；

2.2 将步骤 2.1 得到的混合液全部转入 MTC-全自动检测管中；

2.3 取 10 μ l 的 MTC-阳性对照或 MTC-阴性对照加入 MTC-全自动检测管中，盖好检测管管盖；

2.4 其余操作同步骤【检验方法】1.2-1.3。

【阳性判断值或者参考区间】

检测程序运行结束后，适用仪器自动报告阴阳性。

检验结果分别显示 MTC 和 IC 的检测结果。

MTC 检测结果应呈现典型 S 型扩增曲线（包括未到平台期的 S 曲线）。当 MTCT $\leq$ 40 时，MTC 为阳性；否则，MTC 为阴性。

IC 检测结果应呈现典型 S 型扩增曲线（包括未到平台期的 S 曲线）。当 ICT $\leq$ 40 时，IC 为阳性；否则，IC 为阴性。

【检验结果的解释】

表 2 检验结果及其解释

检验结果	解释
“阳性”	样本中检测到结核分枝杆菌复合群目标 DNA。
“阴性”	样本中未检测到结核分枝杆菌复合群目标 DNA，并且内标检测满足接受标准。
“无效”	内标检测不满足接受标准，不确定样本中是否存在结核分枝杆菌复合群。
“无结果”	检测系统没有收集到足够的数据。

1. 需重新检测的情况

如果出现以下任意一种情况，需使用新的 MTC-全自动检测管重新进行检测。

- 检验结果为“无效”：例如，样本处理不当或 CPA 反应试剂被抑制；
- 检验结果为“无结果”：例如，实验操作者中途终止了测试；
- 外部质控（MTC-阳性对照和 MTC-阴性对照）检验结果异常：例如，MTC-阴性对照检验结果为“阳性”，可能存在污染。

2. 质量控制

本试剂盒包括内部质控和外部质控。

2.1 内部质控

本试剂盒的内部质控即内标系统由内标模板（干燥后附着于离心管底的非传染性细胞）和一套与其对应的 CPA 系统（含 5 条引物和 1 条特异性荧光探针）组成，用以监测是否发生样本处理失败、扩增试剂失效或适用仪器故障。

检验结果为“阳性”时，不要求内标检测满足接受标准；检验结果为“阴性”时，内标检测结果须满足接受标准，否则检验结果为“无效”。

2.2 外部质控

本试剂盒的外部质控包括 MTC-阳性对照和 MTC-阴性对照。

MTC-阳性对照是含有一定浓度的结核分枝杆菌复合群特异性片段的人工构建质粒溶液，用于排除扩增试剂失效或适用仪器故障；MTC-阴性对照是蒸馏水，用于监测试剂或环境是否被污染。外部质控仅用于排除故障和实验室质量控制。

MTC-阳性对照的检验结果应为“阳性”，MTC-阴性对照的检验结果应为“阴性”。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检验结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其他实验室检查及治疗效果等情况综合考虑³。

2. 不合理的标本采集、运送及处理或标本中细菌含量过低均有可能导致假阴性结果。
3. 待测靶核酸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。
4. 未经验证的其他干扰或扩增抑制因子等可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 对“结核分枝杆菌 PCR 检测试剂盒用国家参考品”⁷（简称国家参考品）检测的符合情况

- 1.1 阴性参考品符合率：检测国家参考品中的 15 份阴性参考品，结果全部为阴性，符合率 100%；

- 1.2 阳性参考品符合率：检测国家参考品中的 15 份阳性参考品，结果全部为阳性，符合率 100%；

- 1.3 最低检出量：检测国家参考品中的最低检出量参考品，S1、S2 为阳性。

- 1.4 重复性：检测国家参考品中的重复性参考品（J1—J10），结果均呈阳性，且 CV 不高于 15%。

2. 最低检测限

本试剂盒对痰标本的最低检测限为 100 个菌/ml。

3. 企业阴性、阳性参考品的检测符合情况

检测企业阴性参考品 N1、N2，结果全部为阴性，符合率 100%；

检测企业阳性参考品 P1、P2，结果全部为阳性，符合率 100%。

4. 重复性

检测企业重复性参考品 J1-J10（100 个菌/ml），结果全部为阳性，符合率 100%，且 CV 不高于 15%。

5. 分析特异性^{8、1}

- 5.1 交叉反应

本试剂盒检测非结核分枝杆菌（见表 3）的检测结果均为阴性，无交叉反应。

表 3 用于交叉反应研究的非结核分枝杆菌

名称	测试浓度	测试结果
堪萨斯分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
海分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
土地分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
次要分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
溃疡分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性

戈登分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
蟾蜍分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
鸟分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
瘰癧分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
亚洲分枝杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
苏加分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
龟分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
偶发分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
耻垢分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
脓肿分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
胃分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
胞内分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
草分枝杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
施氏分枝杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
龟脓分枝杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性

本试剂盒检测呼吸道常见病原体（见表 4）的检测结果均为阴性，无交叉反应。

表 4 用于交叉反应研究的呼吸道常见病原体

名称	测试浓度	测试结果
肺炎链球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
流感嗜血杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
大肠杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
表皮葡萄球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
隐球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
人流感病毒（A 型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人流感病毒（B 型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人类副流感病毒（1 型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人类副流感病毒（2 型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
人类副流感病毒（3 型）	10 ⁵ PFU/测试	阴性
金黄色葡萄球菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
诺卡氏菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
绿脓杆菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
白色念珠菌	10 ⁶ 个菌/测试	阴性
百日咳杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
嗜肺军团菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性
北京棒杆菌	10 ⁴ 个菌/测试	阴性

5.2 干扰物质

以下外源性药物（见表 5）在药代动力学峰值浓度范围内对本试剂盒的检测结果不产生干扰。其他干扰物质未进行研究，其影响不详。

表 5 用于干扰研究的外源性药物

名称	测试浓度	检测结果
利福平	25µg/ml	合格
链霉素	50µg/ml	合格
乙胺丁醇	5µg/ml	合格
异烟肼	6µg/ml	合格
吡嗪酰胺	50µg/ml	合格
左氧氟沙星	17µg/ml	合格
羟甲唑啉	0.5mg/ml	合格
莫匹罗星	5mg/测试	合格
卡那霉素	35µg/ml	合格
扎那米韦	142ng/ml	合格
地塞米松	5mg/ml	合格

6. 临床评估

本试剂盒在中国三家具有临床试验资质的医院进行临床试验，对其临床准确性和可靠性进行了验证。本次临床共入组 592 例痰标本，临床准确性和可靠性验证结果如下。

6.1 准确性：本试剂盒与已上市荧光 PCR 试剂盒（对照试剂盒）的对比检测结果如下：

总入组样本		对照试剂盒		阳性符合率	阴性符合率	总符合率	Kappa
		阳性	阴性				
本试剂盒	阳性	254	1	96.21%	99.70%	98.14%	0.96
	阴性	10	327				

6.2 可靠性：本试验共检测 592 例痰标本，未出现“无效”结果。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅供专业人员使用，使用前请仔细阅读本说明书。非本产品的性能或操作方法不当等而导致的错误判定及其后果，本公司不承担任何责任。
2. 本试剂盒仅用于结核分枝杆菌复合群的体外诊断检验。结核病的诊断需要结合患者症

状、体征、影像学检查结果，以及其他多种辅助诊断方法进行综合判断³。

3. 检测注意事项:

- 1) 本试剂盒为一次性使用产品。工作台及所需物品定期用 1%次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
- 2) 实验室应按照相关国家规定进行相应实验室质量控制，以避免因实验室污染造成的试剂盒检测假阳性的结果。
- 3) 检验人员使用的防护设施，如手套、实验服等，应分区管理，避免引入污染，导致检测结果出错。
- 4) 由于含有较多血液的标本有可能对测定结果产生影响，应避免使用。
- 5) 操作 MTC-全自动检测管时，不允许挤压 MTC-全自动检测管的中下部位。
- 6) MTC-DNA 提取液中含有不溶颗粒，在吸取前应充分混匀，以保证磁珠全部转入检测管。
- 7) 保持 MTC-全自动检测管的二维码（位于检测管盖上方）清洁、清晰，不可涂写、遮掩，以防影响二维码的功能。
- 8) MTC-全自动检测管开盖加样后应立即上机检测。若需保存，保存时间不超过 3 小时（将检测管插入适用仪器的样本室前，需摇动混匀）。
- 9) 应严格按照本说明书的操作顺序进行操作，不允许在录入标本信息前将检测管放入适用仪器的样本室。
- 10) 应先处理除 MTC-阳性对照之外的检测管，盖上盖子，最后添加 MTC-阳性对照。
- 11) 处理 MTC-阳性对照时，打开盖子前务必先离心，并尽量缩短打开盖子的时间。
- 12) 在检测过程中请勿打开适用仪器的盖子。
- 13) 检测结束后，请勿打开 MTC-全自动检测管盖子。

4. 判定注意事项

检测结束后，适用仪器的软件会自动保存检验结果，可在适用仪器“查看”界面中查询以往检验结果。

5. 操作注意事项

- 1) 标本作为具有感染危险性的物质，操作中需要加以注意，请实施必要的生物危害防止对策。
- 2) 试剂误入眼睛或口中，或者沾染到皮肤上时，立刻用大量清水充分冲洗，必要时接

受医生的诊治。

3) MTC-全自动检测管上机检测前, 确保检测管管身外壁无液体及其他粘附物。

6. 使用注意事项

1) 必须按照本说明书指定的储存条件对本试剂盒进行保存。

2) 为防止试剂变质, 在使用时, 仅取出所需量。剩余量按指定条件进行保存。

3) 为避免污染检验环境, 请勿用 MTC-阳性对照进行除本使用说明书中规定的操作之外的使用 (如稀释或添加至标本等)。

4) 请勿使用过效期的试剂。

5) 请勿与其他批次混合使用。不得对试剂进行添补加注。

6) 使用前必须目视确认 MTC-全自动检测管没有伤痕、裂纹。

7. 废弃注意事项

1) 使用过的检测管不要打开盖子, 直接按医疗废弃物处理。

2) 所有标本和其他材料使用完毕后应按照【医疗废物管理条例】⁹ 处理。

【标识的解释】

无

【参考文献】

1. 刘容枝,《结核分枝杆菌复合群脱氧核糖核酸检测试剂分析性能评估浅析》, 中国防痨杂志, 2015。

2. World Health Organization,《Global tuberculosis report 2018》。

3. 刘容枝,《结核分枝杆菌抗体检测试剂及相关问题的探讨》, 中国防痨杂志, 2018。

4. 中华人民共和国国家卫生健康委员会,《肺结核诊断》(WA288-2017), 2017。

5. Xu G, Hu L, Zhong H, etc. Cross priming amplification: mechanism and optimization for isothermal DNA amplification.Sci.Rep.2012;2:246。

6. 中国防痨协会. 结核病实验室检验规程. 北京: 人民卫生出版社, 2015。

7. 结核分枝杆菌 PCR 检测试剂盒用国家参考品使用说明书: 中国食品药品检定研究院。

8. 国家食品药品监督管理总局,《结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂注册技术审查指导原则》(2015 年第 65 号)。

9. 医疗废物管理条例: 中华人民共和国国务院于 2003 年 6 月 16 日发布。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：杭州优思达生物技术有限公司

住所：浙江省杭州市滨江区南环路 3766 号 801-808 室

电话：

传真：

公司网址：

售后服务单位名称：杭州优思达生物技术有限公司

技术支持：

传真：

生产地址：杭州市滨江区长河街道秋溢路 399 号 C 幢一、二层，A 幢五层

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】