

受理号：CSZ1900135

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产 品 中 文 名 称：结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应
检测试剂盒（酶联免疫法）

产 品 管 理 类 别：三类

申 请 人 名 称：广州市雷德生物科技有限公司

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.....	13
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

广州市雷德生物科技有限公司

二、申请人住所

广州市高新技术产业开发区揽月路 80 号科技创新基地 D 区

701

三、生产地址

广州市高新技术产业开发区揽月路 80 号科技创新基地 D 区

7 楼、G 区 6 楼

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本产品由细胞刺激试剂盒和 γ -干扰素检测试剂盒组成。具体成分见表1和表2。

表1 细胞刺激试剂盒主要组成成分

名称		颜色	数量	主要成分
细胞刺激 培养管	阳性对照 (P)	黄	24	外源凝集素
	特异性刺激 (T)	蓝	24	结核特异性抗原
	阴性对照 (N)	白	24	Tris

表2 γ -干扰素检测试剂盒主要组成成分

名称		规格	数量	主要成分
试剂: 01	样本稀释液	20 mL/瓶	1	含 BSA 的 PBS 基质液
试剂: 02	洗涤液 (1 $\times$)	250 mL/瓶	1	含 Tween 的 PBS 基质液
试剂: 03	抗体液	6 mL/瓶	1	生物素标记的 IFN- γ 抗体
试剂: 04	酶标液	6 mL/瓶	1	HRP 标记的链霉亲和素
试剂: 05	底物 A	1.2 mL/瓶	1	3' 3' 5' 5' -四甲基联苯
试剂: 06	底物 B	12 mL/瓶	1	过氧化脲
试剂: 07	终止液	12 mL/瓶	1	1.0 M 硫酸
校准品		1215 pg/管	1	含 1215 pg 的 IFN- γ 冻干
高值质控品		200 pg/管	1	含 200 pg 的 IFN- γ 冻干品
低值质控品		20 pg/管	1	含 20 pg 的 IFN- γ 冻干品
酶标板		96 孔/板	1	小鼠抗人 IFN- γ 抗体 (IgG)
封板膜		张	3	/

（二）产品预期用途

本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝血中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应。

本产品用于临床结核病的辅助诊断。

（三）产品包装规格

24 人份/盒

（四）产品检验原理

本试剂盒基于 γ -干扰素释放试验原理，通过检测血液中的记忆性淋巴细胞在再次接触结核分枝杆菌特异性抗原体外刺激时分泌的 γ -干扰素（ $\text{IFN-}\gamma$ ），判断机体内是否存在针对结核分枝杆菌的特异性 T 细胞反应。本试剂盒选择在卡介苗和大多数非结核分枝杆菌中普遍缺失的结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6 和 CFP-10，通过基因工程技术修饰后表达成为刺激抗原，与新鲜采集的抗凝全血混合并孵育后，用酶联免疫法（ELISA）检测特异性释放的 $\text{IFN-}\gamma$ 水平。

$\text{IFN-}\gamma$ 的检测采用双抗体夹心法。经孵育，样本中的 $\text{IFN-}\gamma$ 与微孔内包被的“第一抗体”、反应体系中 B10 标记的“第二抗体”及 HRP 标记的链霉亲和素（SHRP）形成夹心复合物。加入 TMB 底物生成的蓝色中间产物经 H_2SO_4 终止反应，转化为橙色终产物。可溶性橙色终产物在 450 nm 处达最大光吸收值，其吸

光值的大小与样本中 IFN- γ 的浓度水平呈正相关，通过建立标准曲线可计算样本中 IFN- γ 的浓度。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品主要原材料包括小鼠抗-人 IFN- γ -包被抗体、小鼠抗-人 IFN- γ -标记抗体、结核特异性抗原、外源凝集素、链霉亲和素标记的辣根过氧化酶、人 IFN- γ 。链霉亲和素标记的辣根过氧化酶和人 IFN- γ 购自外部供应商，其他主要原材料均由申请人生产。各主要原材料均通过质量标准并检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

申请人设计了完整的企业参考品，包括准确度参考品、线性参考品、精密度参考品、阳性参考品和阴性参考品。其中准确度参考品、线性参考品和精密度参考品采用人 IFN- γ 稀释制备而成；阴性参考品来源于 20 份健康人和非结核患者新鲜外周静脉血样本；阳性参考品来源于 20 份临床确诊的结核患者样本，包括 10 份细菌学阳性和 10 份细菌学阴性样本。

本试剂盒设置了高、低值质控品，其来源于人 γ -干扰素较高浓度血浆，通过稀释，冻干用于检测过程中试剂和操作的质量控制。

（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。

申请人对样本孵育时间、酶结合液孵育时间、显色时间、洗涤次数以及全血样本孵育温度、全血样本孵育体积等进行筛选和优化，并通过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主要包括：准确度、线性、最低检测限、精密度、分析特异性（交叉反应和干扰试验）、阴阳性参考品符合率、校准品基质效应和企业标准品溯源性。

1. 准确度

申请人采用三批试剂盒，检测准确度参考品，检测结果相对偏差均在 $\pm 15\%$ 以内。

2. 线性

使用人 IFN- γ 阴性血浆对人 IFN- γ 血浆进行稀释，制备不同浓度水平样本，采用三批试剂盒，检测不同浓度水平的样本，最终确定线性范围为 4.1 ~ 900 pg/mL。并对线性范围下限进行总允许误差的评价，三个批次的线性范围下限的总允许误差分别为 1.607 pg/mL、1.743 pg/mL、2.346 pg/mL。

3. 最低检出限

申请人采用三批试剂盒，对稀释后的系列浓度 γ -干扰素浓度的样本进行检测，最终确定试剂最低检出限为不高于 10.0 pg/mL。

4. 精密度

申请人采用三批试剂盒，分别检测重复性参考品和精密度参考品，分别评估了批内重复性/批间差异、日内/日间以及不同操作者之间的精密度。结果显示，精密度参考品结果（CV）均 $\leq 15\%$ ；阴性重复性参考品检测结果均为阴性，阳性重复性参考品结果均为阳性。

5. 分析特异性

5.1 申请人对常见的干扰物（胆红素在 35 mg/mL 以下、血红蛋白在 13.5 mg/mL 以下、甘油三酯在 7.68 mM 以下、硫酸阿巴卡韦在 0.036 mg/mL 以下、环孢霉素在 0.054 mg/mL 以下、泼尼松龙在 0.056 mg/mL 以下、抗凝剂肝素钠和肝素锂在 25 IU/mL 以下）添加至样本中，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，对本试剂盒结果未有干扰。

5.2 申请人对细胞因子（IL-1 β ，IL-2，IL-3，IL-4，IL-5，IL-6，IL-10，IL-12，TNF- α ，IL-1 α ，IFN- α 2b，IFN- β ）在 1000 pg/mL 以下时，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，对本试剂盒结果未有干扰。

5.3 申请人对类风湿因子在 200 IU/mL 以下、抗核抗体在 200 U/mL 以下、抗线粒体抗体滴度在 1:1 以下时，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，对本试剂盒结果未有干扰。

5.4 申请人对 15 例常见分枝杆菌（龟分枝杆菌、鸟胞内复合分枝杆菌、海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌）感染患者样本进行测定，其中 13 例全血测定结果为阴性，特异性为 86.67%。

6. 阴阳性参考品符合率

申请人采用三批试剂盒对阴性参考品和阳性参考品进行检测，阴性符合率和阳性符合率均满足要求。

7. 企业标准品溯源性

企业标准品溯源至 NIBSC 87/586 IFN- γ 标准品。

（四）阳性判断值或参考区间研究

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 332 例临床样本（129 例结核患者样本，203 例非结核患者样本）进行检测，结果显示：阴性对照中 IFN- γ 浓度(N) ≤ 400 pg/mL 时，采用 ROC 曲线法进行分析，当 T-N 为 20 pg /mL 时，约登指数为最大值，同时为减少系统误差，参考同类试剂，增加 T-N $\geq 25\%N$ 的判读要求。

申请人采用申报产品对 162 例临床样本（90 例结核患者样本和 72 例非结核患者样本）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，本产品具有较好的灵敏度和特异性。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的效期稳定性和开封稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。同时，对样本保存稳定性和冻融次数进行了研究，确定了临床样本的有效保存时间。

效期稳定性研究：采用三批申报产品中的 γ -干扰素检测试剂盒于规定的储存条件下（ $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ ）保存至 0、6、9、12，13、14 个月时，进行准确度评估、测量系统线性评估、检测限评估和精密度评估；细胞刺激试剂盒于规定的储存条件下（ 28°C 以下）保存至 0、6、9、12，13、14 个月时，进行阴性参考品符合率、阳性参考品符合率和重复性检测。结果显示，在上述各个时间点储存的申报产品，各项检测指标均符合要求，因此确定申报产品的有效期为 12 个月。

开封稳定性研究：采用三批申报产品，其中 γ -干扰素检测试剂盒在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 环境下，开封后储存 2 周、4 周、5 周后进行准确度评估、测量系统线性评估、检测限评估、精密度评估；细胞刺激试剂盒在 28°C 以下环境中，开封后储存 2 周、4 周、5 周后进行阴性参考品符合率、阳性参考品符合率和重复

性检测。结果显示，各项检测指标均符合技术要求。因此确定申报产品的开封有效期为 4 周。

申请人对样本保存稳定性以及样本冻融次数进行了研究。结果显示：样本最好于采集后 6 小时内使用； -15°C 以下保存的 IFN- γ 血浆样本有效期为 1 个月， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存的 IFN- γ 血浆样本有效期为 7 天；IFN- γ 血浆样本，存于 -15°C 或更低温度下，可于 1 个月以内检测，反复冻融次数不能超过 3 次。

三、临床评价摘要

申请人在重庆市公共卫生医疗救治中心、广西壮族自治区龙潭医院、武汉市传染病医院进行了临床试验。采用申报产品与对比试剂对临床样本进行比较研究，验证本产品的临床性能，对检测结果不一致的样本结合临床结果（如痰涂、菌培、核酸检测等）和患者的临床信息对差异原因及可能结果进行分析。对比试剂选择已上市同类产品，QIAGEN 公司的结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）（注册证号：国械注准 20173406702）。

本临床试验共纳入临床样本 1065 例，其中脱落 1 例（受试者签署知情同意后，由于个人原因不愿意采集血样），有 4 例受试者为重复入组，需排除不纳入统计，故有效受试例数为 1060 例。其中临床诊断信息为结核患者 587 例（55.38%），其中包

括单纯肺外结核 32 例；非结核疾病患者 473 例（44.62%），其中包括肺癌、上呼吸道感染、慢性阻塞性肺疾病、支气管炎、肺炎、社区获得性肺炎、支气管扩张伴感染、支气管肺炎、肺气肿、呼吸道感染、急性扁桃体炎、胸膜炎、咽炎、支气管哮喘、非结核分枝杆菌感染等非结核的其他呼吸道疾病患者以及其他易混淆疾病的患者病例。

试验结果显示，本产品与对比试剂对于临床样本检测的阳性符合率为 98.12%，阴性符合率为 90.75%，总符合率为 94.62%。采用 Kappa 检验方法进行统计学分析，Kappa 值为 0.888，检测结果高度一致。本产品与临床诊断对比，检测灵敏度为 82.10%，特异性为 60.85%，总符合率为 72.60%。

临床试验纳入了 436 例有涂片结果且临床诊断为肺结核的患者样本。在涂片阳性的肺结核患者样本中，本试剂的阳性检出率为 88.57%；在涂片阴性的肺结核患者样本中，本试剂的阳性检出率为 78.55%。

临床试验纳入了 32 例临床诊断为单纯肺外结核患者样本，本试剂盒检出 25 例阳性，4 例阴性，不确定 3 例。阳性检出率为 78.13%。

综上所述，本产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面研究，临床试验符合要求。

四、风险分析及说明书提示

参照“YY/T 0316-2016 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采集装置、样本质量以及样本量、样本运输条件、样本处理等因素影响，检测试剂盒试剂设计以及生产过程包装运输的因素影响，同时也受到实验操作、试验设备及其软件、实验环境等限制，导致可能得出假阳性或假阴性、无效或错误的检测结果。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。

本产品阴性检测结果不能排除结核分枝杆菌感染或结核病的可能性。导致假阴性结果的原因可能是受试者本身免疫系统缺陷如接受免疫抑制治疗或获得性免疫缺陷综合征（AIDS）。当检测结果呈阳性时，也有可能因其它分枝杆菌（*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*）引起，还需要同其它诊断方法相结合，如影像学诊断、菌涂、菌培等。

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：本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝血中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应。
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体外诊断试剂产品注册，属于优先审批项目（编号：20190011）。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 09 日

附件：产品说明书

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）

说明书

【产品名称】

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂盒（酶联免疫法）

【包装规格】

24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝血中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应。

本产品用于临床结核病的辅助诊断，仅供体外诊断使用。

结核病是由结核分枝杆菌复合群中的结核分枝杆菌、牛分枝杆菌和非洲分枝杆菌引起的慢性传染性疾病，可累及全身各个器官，尤以肺结核为最多见，严重危害人健康。根据世界卫生组织估计，全球大约有 1/3 的人为结核分枝杆菌的感染者，同时约有 10% 的感染者将转化为活动性结核。

在现有的诊断方法中，细菌学检查（包括涂片法和培养法）虽然是结核病诊断的金标准，但这些方法的敏感性较低，且菌阴结核在临床上较为常见。同时，肺外结核的诊断标本获取难度大；影像学为非特异性诊断，结果判定受主观影响较大；结核菌素试验（TST）易受合并症和免疫状态影响，且与卡介苗接种存在交叉反应；血清学诊断准确度较差，结果不稳定，临床意义有限；核酸扩增诊断方法（NAA）虽然具有较高特异性，但需要获得带菌标本，且对实验室的技术条件要求较高。 γ -干扰素释放分析（IGRA）作为一种基于细胞免疫的体外诊断技术，通过体外检测人新鲜外周静脉抗凝血中被结核分枝杆菌特异性抗原刺激后的 T 细胞释放的 γ -干扰素水平，定性判断其是否具有针对结核分枝杆菌的特异性 T 细胞反应，从而用于临床结核病的辅助诊断。该方法不受卡介苗接种和绝大多数非结核分枝杆菌（NTM）的干扰，受机体免疫状态影响较小，且全血标本容易获得，对实验室技术条件要求不高，临床应用方便。

【检验原理】

本试剂盒基于 IGRA 原理，通过检测血液中的记忆性淋巴细胞在再次接触结核分枝杆菌特异性抗原体外刺激时分泌的 γ -干扰素（IFN- γ ），判断机体内是否存在针对结核分枝杆菌的特异性 T 细胞反应。本试剂盒选择在卡介苗和大多数 NTM 中普遍缺失的结核分枝杆菌特异性抗原 ESAT-6 和 CFP-10，通过基因工程技术修饰后表达成为刺激抗原，与新鲜采集的抗凝全血混合并孵育后，用酶联免疫法（ELISA）检测特异性释放的 IFN- γ 水平。

IFN- γ 的检测采用双抗体夹心法。经孵育，样本中的 IFN- γ 与微孔内包被的“第一抗体”、反应体系中 BIO 标记的“第二抗体”及 HRP 标记的链霉亲和素（SHRP）形成夹心复合物。加入 TMB 底物生成的蓝色中间产物经 H_2SO_4 终止反应，转化为橙色终产物。可溶性橙色终产物在 450 nm 处达最大光吸收值，其吸光值的大小与样本中 IFN- γ 的浓度水平呈正相关，通过建立

标准曲线可计算样本中 IFN- γ 的浓度。

【主要组成成分】

1. 细胞刺激试剂盒：

名称		颜色	数量	主要成分
细胞刺激培养管	阳性对照（P）	黄	24	外源凝集素（PHA）
	特异性刺激（T）	蓝	24	结核特异性抗原
	阴性对照（N）	白	24	Tris

2. γ -干扰素检测试剂盒：

名称		规格	数量	主要成分
试剂：01	样本稀释液	20 mL/瓶	1	含 BSA 的 PBS 基质液
试剂：02	洗涤液（1×）	250 mL/瓶	1	含 Tween 的 PBS 基质液
试剂：03	抗体液	6 mL/瓶	1	生物素标记的 IFN-γ 抗体
试剂：04	酶标液	6 mL/瓶	1	HRP 标记的链霉亲和素（SHRP）
试剂：05	底物 A	1.2 mL/瓶	1	3'3'5'5'-四甲基联苯胺（TMB）
试剂：06	底物 B	12 mL/瓶	1	过氧化脲
试剂：07	终止液	12 mL/瓶	1	1.0 M 硫酸
校准品		1215 pg/管	1	含 1215 pg 的 IFN-γ 冻干品
高值质控品		200 pg/管	1	含 200 pg 的 IFN-γ 冻干品
低值质控品		20 pg/管	1	含 20 pg 的 IFN-γ 冻干品
酶标板		96 孔/板	1	小鼠抗人 IFN-γ 抗体（IgG）
封板膜		张	3	√

备注：

1. 校准品溯源至 NIBSC 87/586 IFN- γ 标准品，经换算，1 IU = 50 pg。
2. 不同批号 γ -干扰素检测试剂盒的试剂组分不可互换使用。
3. 高值质控品、低值质控品均为入血浆，经检测 HBV、HCV、HIV1、HIV2、TP 均为阴性。
4. 其它检测需要，但本产品并未提供的主要设备及耗材如下（必要时补充其它所需的物品）：
 - 10~1000 μ L 单通道移液器、100~300 μ L 多通道移液器及配套的一次性吸头
 - 微孔板振荡器
 - 37 $^{\circ}$ C 恒温箱
 - 酶标仪
 - 洗板机
 - 离心机
 - 1.5mL EP 管

——15 mL 离心管

【储存条件及有效期】

1. 货架储存条件及有效期

- 细胞刺激试剂盒：28℃以下保存，有效期为12个月。
- γ-干扰素检测试剂盒：2~8℃保存，有效期为12个月。
- 生产日期、有效期至：见标签。

2. 开封后储存条件：

- 未用完细胞刺激培养管须与干燥剂一起用自封袋密封，于28℃以下保存。
- 未用完的酶标板须与干燥剂一起用自封袋密封，于2~8℃保存。

3. 开封后有效期：开封后的试剂组分有效期为4周，请在规定效期内使用。

【适用仪器】

酶标仪：满足主波长为450 nm，参考波长为620~630 nm。

【样本要求】

1. 样本类型：人新鲜静脉血。

2. 样本采集：

- 静脉穿刺法采集静脉血，血样采集管宜采用国标肝素钠或肝素锂真空采血管。避免使用溶血、高胆红素或高血脂的样本；
- 每份检测样本的总血量应不少于3 mL。

3. 样本保存：

- 人新鲜静脉抗凝血刺激前必须于室温储存、转移，最好于采集后6个小时内加入细胞刺激培养管中刺激培养，不得冷冻和离心。
- 经刺激实验后分离的血浆样本如7天内用于γ-干扰素检测，可在2~8℃暂存，如保存于-15℃或更低温度下，可于1个月以内检测，反复冻融次数不能超过3次。

4. 样本运输：

经刺激试验后分离的血浆样本于8℃以下运输。

【检验方法】

一、IFN-γ 体外释放

1. 样本采集：采用肝素真空采血管收集不低于3 mL人静脉血。

2. 样本分装：轻轻上下颠倒混匀采血管8次，分别吸取0.6 mL人新鲜静脉抗凝血，加入细胞刺激培养管（N、T、P）中，上下颠倒混匀培养管5次。

3. 培养：将细胞刺激培养管置于37±0.5℃的恒温培养箱中培养20±2 h，培养过程中保持培养管直立。如果混匀后细胞刺激培养管不能立即开始孵育培养，请于室温暂存，并在1小时内放入37±0.5℃恒温培养箱中。

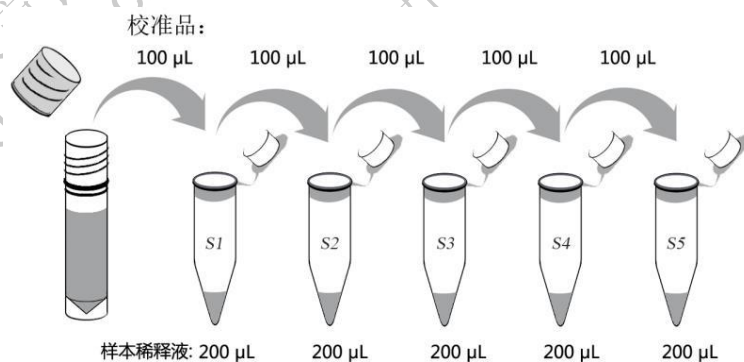
注：操作前确保恒温箱已经平衡至37℃！

4. 分离：培养后的培养管可采用离心（1000 g，5分钟）或其他方式分离血浆。

二. IFN- γ 检测

I) 实验前准备

1. 复温：待测样本和试剂盒在使用之前应恢复温度至室温（22~28℃）。
2. 冻干品溶解：校准品、高值质控品、低值质控品均采用 0.5 mL 的试剂 01（样本稀释液）进行溶解，混匀。
3. 校准品稀释：采用试剂 01 对溶解后校准品进行浓度的梯度稀释，具体操作示意图和试剂配制如下：



校准品	试剂 01 体积 (µL)	IFN- γ 来源体积 (µL)	最终 IFN- γ 浓度(pg/mL)
S1	200	稀释的校准品: 100	810
S2	200	校准品 S1: 100	270
S3	200	校准品 S2: 100	90
S4	200	校准品 S3: 100	30
S5	200	校准品 S4: 100	10

注：稀释后的校准品需于当天使用，不得冻存！

4. 酶结合液：试剂 03（抗体液）与试剂 04（酶液）按 1: 1 的体积比混合（如 96 孔测试：6 mL 试剂 03 + 6 mL 试剂 04），充分混匀后待用。建议在使用前 5~10 分钟内完成配制，混合后的酶结合液在当天内有效。
5. 显色液：试剂 05（底物 A）与试剂 06（底物 B）按 1: 10 的体积比混合（如 96 孔测试：1.2 mL 试剂 5 + 12 mL 试剂 06），充分混匀后避光待用。混合后的显色液在 2 小时内有效。

II) 实验步骤

1. 拆封酶标板的铝箔包装，取出本次实验所需的板条。剩余部分应及时封存，避免受潮。

2. 采用移液器在所有待测酶标板孔内每孔加入 50 µL 试剂 01。

注：加液时吸头可轻贴微孔下壁，以避免吸头出现挂液而造成加量不足或孔间差异大。

3. 使用移液器将校准品 S1 至 S5、S6（样本稀释液）各复孔、高值质控品 Hc 和低值质控品 Lc 单孔，各 50 µL 加至酶标板中，后每孔加入 50 µL 血浆样本（推荐布板如下）：

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
A	S1	S1	N-1	P-3	T-6	N-9	P-11	T-14	N-17	P-19	T-22

B	S2	S2	T-1	N-4	P-6	T-9	N-12	P-14	T-17	N-20	P-22
C	S3	S3	P-1	T-4	N-7	P-9	T-12	N-15	P-17	T-20	N-23
D	S4	S4	N-2	P-4	T-7	N-10	P-12	T-15	N-18	P-20	T-23
E	S5	S5	T-2	N-5	P-7	T-10	N-13	P-15	T-18	N-21	P-23
F	S6	S6	P-2	T-5	N-8	P-10	T-13	N-16	P-18	T-21	N-24
G	Hc		N-3	P-5	T-8	N-11	P-13	T-16	N-19	P-21	T-24
H	Lc		T-3	N-6	P-8	T-11	N-14	P-16	T-19	N-22	P-24

注：加样时吸头可轻触微孔液面，以避免吸头出现挂液。整个加样过程要求不超过 15 分钟。

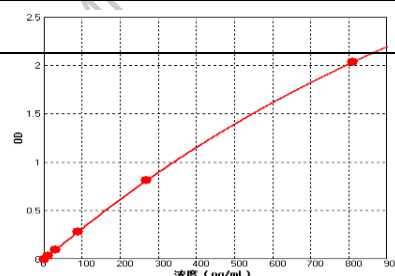
4. 裁剪适当大小的封板膜封板，平放置微孔板振荡器上，调节转速为 220~280 转/分钟，室温下摇动孵育 60 分钟。
5. 弃液，洗板。
 - a. 如采用手动洗涤每个微孔用 250 μ L 试剂 2 洗涤至少 3 次。洗板操作如下：
 - a). 采用移液器，每孔中加入 250 μ L 试剂 2，静置 1 分钟。
 - b). 单手紧握酶标板框，迅速翻转酶标板并垂直向下甩干微孔内的洗液。
 - c). 弃液后，及时在干净的吸水纸上拍干板孔内的残余液。
 - b. 如采用自动洗板，按照自动洗板机操作说明书使用，洗涤至少 3 次。需确保每个微孔在每次清洗时，能完全被洗涤液充满至顶。每次清洗间至少有 1 分钟的浸泡期。
6. 每孔加入 100 μ L 酶结合液，封板膜封板，放置振荡器上，220~280 转/分钟，室温下摇动孵育 60 分钟。
7. 弃液，按步骤 5 洗涤至少 5 次。
8. 每孔加入 100 μ L 显色液，平放置振荡器上，220~280 转/分钟，室温下摇动孵育 20 ± 2 分钟。

注：显色过程应避免强光照射，避光操作。
9. 每孔加入 100 μ L 试剂 07，混匀，终止显色。
10. 在 10 分钟内使用酶标仪在光吸收模式下以 450 nm、630 nm 双波长测定光吸收（OD）值。
11. 计算 $OD_{450-630}$ 值：以该孔 $OD_{450\text{ nm}}$ 减去 $OD_{630\text{ nm}}$ ，再扣除空白孔（S6） $OD_{450-630}$ 平均值，计算输出各微孔测定 $OD_{450-630}$ 值。

三. 结果输出

1. 计算校准品 S1 至 S6 两孔的平均 $OD_{450-630}$ 值。
2. 将校准品的平均 $OD_{450-630}$ 值，采用“四参数（4-Parameter）”法进行标准曲线建立：
 - a. 测定结果计算方法一：酶标仪自带多种常用“算法”的数据分析程序，可直接选用“四参数”分析模型，输出结果。
 - b. 测定结果计算方法二：采用其它可进行“四参数”法拟合运算的专业软件进行数据处理。
 - c. 标准曲线例图：此标准曲线仅供参考。

校准品	X(μ g/mL)	Y($OD_{450-630}$)	四参数
S1	810	2.068	



S2	270	0.848	
S3	90	0.315	
S4	30	0.128	
S5	10	0.067	
S6	0	0.033	

注：采用“四参数”法拟合时，以X轴表示浓度，Y轴表示OD值。

四. 质量控制方法

1. 空白孔：空白孔 OD₄₅₀₋₆₃₀ 值均应不大于 0.100。
2. 由各校准品平均 OD₄₅₀₋₆₃₀ 值拟合而得曲线的相关系数 $r \geq 0.9800$ 。
3. 质控品：高值、低值质控品通过拟合的标准曲线方程计算浓度分别在 400 ± 100 pg/mL， 40 ± 15 pg/mL 的范围内。
4. 如不满足以上质控要求，提示试剂盒变质失效或实验操作失误，本次实验结果无效。

【阳性判断值】

1. 当 $N > 400$ pg/mL，则不能确定是否感染结核分枝杆菌；
2. 当 $N \leq 400$ pg/mL，判断标准如下：

T-N (pg/mL)	T-N (pg/mL)	P-N (pg/mL)	结果判定
≥ 20	$\geq 25\%N$	任何值	阳性
≥ 20	$< 25\%N$	≥ 25	阴性
≥ 20	$< 25\%N$	< 25	不确定
< 20	/	≥ 25	阴性
< 20	/	< 25	不确定

备注：

1. N：阴性对照管 IFN- γ 浓度；
T：特异性刺激管 IFN- γ 浓度；
P：阳性对照管 IFN- γ 浓度。
2. 特异性刺激（T）或者阳性对照（P）的反应结果可能会落在标准曲线的线性高值范围之外，对拟合浓度的精确性有一定影响，但不会影响结果判读。
3. 阴性对照（N）、特异性刺激（T）或者阳性对照（P）的计算 OD 值为负值时，T-N 或 P-N 为负值时，均按零参与计算。
4. 本次阳性判断值研究共纳入临床样本 332 份，其中包含结核患者样本 129 例，非结核患者样本 203 例。排除 1 例 $N > 400$ pg/mL 的样本后，采用 ROC 曲线法进行分析，曲线下面积为 0.949，当 T-N 为 20 pg/mL 时，敏感性为 85.9%，特异性为 93.6%，约登指数为最大值。

【检验结果的解释】

1. 阳性：可能存在结核感染 T 细胞免疫反应；

2. 阴性：可能不存在结核感染 T 细胞免疫反应；
3. 不确定：不能确定是否存在结核感染 T 细胞免疫反应；
4. 不确定样本的处理：不确定的结果是非常罕见的，若怀疑与 ELISA 操作上的因素有关，可将已刺激的血浆样本重新进行 ELISA 检测。若怀疑与测试者的免疫状况有关，因过低的 P 值或过高的 N 值所造成的不确定结果预计不会在复测时改变，不确定的结果应如实报告，医生可酌情采取其他程序。

【检验方法的局限性】

1. 样品测试结果用于辅助诊断结核病，不能作为结核病确诊或排除病例的依据。
2. 阴性检测结果不能排除结核分枝杆菌感染或结核病的可能性。导致假阴性结果的原因可能是受试者本身免疫系统缺陷如接受免疫抑制治疗或 AIDS。
3. 当检测结果呈阳性时，也有可能因其它分枝杆菌 (*M. kansasii*, *M. szulgai*, *M. marinum*) 引起，还需要同其它诊断方法相结合，如影像学诊断、菌涂、菌培等。

【产品性能指标】

1. 准确度：对 γ -干扰素准确度参考品 A1、A2 各重复检测 3 次，测量浓度与理论值的结果偏差在 $\pm 15\%$ 以内；
2. 检测限：最低检测限不高于 10.0 pg/mL；
3. 线性：在 4.1~900 pg/mL 的检测范围内，相关系数 r 不小于 0.9900；
4. 精密度：变异系数 $CV \leq 15\%$ ；
5. 批间差：变异系数 $CV \leq 15\%$ ；
6. 阴性参考品符合率：阴性参考品符合率不低于 80%；
7. 阳性参考品符合率：阳性参考品符合率不低于 75%。
8. 分析特异性：
 - a) 常见的干扰物（胆红素在 35 mg/mL 以下、血红蛋白在 13.5 mg/mL 以下、甘油三酯在 7.68 mM 以下、硫酸阿巴卡韦在 0.036 mg/mL 以下、环孢霉素在 0.054 mg/mL 以下、泼尼松龙在 0.056 mg/mL 以下、抗凝剂肝素钠和肝素锂在 25 IU/mL 以下）添加至样本中，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，对本试剂盒结果未有干扰。
 - b) 细胞因子 (IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , IL-1 α , IFN- $\alpha 2b$, IFN- β) 在 1000 pg/mL 以下时，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，对本试剂盒结果未有干扰。
 - c) 类风湿因子在 200 IU/mL 以下、抗核抗体在 200 U/mL 以下、抗线粒体抗体滴度在 1:1 以下时，实验组与对照组偏差在 $\pm 15\%$ 以内，对本试剂盒结果未有干扰。
 - d) 对 15 例常见分枝杆菌（龟分枝杆菌、鸟胞内复合体分枝杆菌、海分枝杆菌、溃疡分枝杆菌）感染患者样本进行测定，其中 13 例全血测定结果为阴性，特异性为 86.67%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，产品使用前请认真阅读说明书，以便正确操作。
2. 产品中的酶标板板条为一次性检验用品，请勿重复使用。
3. 产品在使用时不可混用不同批号产品的组份，不得使用任何已过期的组份。
4. 每次测定试验应包含梯度稀释的校准品检测，建立正确的标准曲线。
5. 试剂使用前必须平衡温度至室温（22~28℃），溶液组份在使用前应确保混匀。
6. 所有试剂应避免暴露在高温或阳光直射，吸取每个试剂组份及样本时，必须使用干净的一次性吸头，避免交叉污染。
7. 操作时，操作人员需穿戴实验工作服、一次性手套、口罩等，并按照有关规程妥善处理所有试剂及材料。
8. 试剂盒中的高值质控品、低值质控品为人源血浆，经检测 HBV、HCV、HIV1、HIV2、TP 均为阴性，血浆中不含上述传染源，但应视为潜在传染源小心处理。
9. 试剂盒含有微量防腐剂和稳定剂，可刺激皮肤和粘膜，请勿直接接触。不慎接触后立即用吸液面料擦拭后用大量清水冲洗，必要时就医。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断医疗器械
	参考使用说明书
	分类编号
	生产批号
	生产日期
	有效期至
	储存温度
	温度上限

【参考文献】

- [1] Philips J A, Ernst J D. Tuberculosis pathogenesis and immunity. Annual Review of Pathology, 2012, 7(1):353.
- [2] O'Garra A, Redford P S, McNab F W, et al. The Immune response in tuberculosis. Annual Review of Immunology, 2013, 31(31):475.
- [3] Mehra S, Foreman T W, Didier P J, et al. The DosR regulon modulates adaptive immunity and is

essential for Mycobacterium tuberculosis persistence. American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine, 2015, 191(10):1185.

[4]Arend S M, Geluk A, van Meijgaarden K E, et al. Antigenic equivalence of human T-cell responses to Mycobacterium tuberculosis-specific RD1-encoded protein antigens ESAT-6 and culture filtrate protein 10 and to mixtures of synthetic peptides. Infection & Immunity, 2000, 68(6):3314.

[5]Berthet F X, Rasmussen P B, Rosenkrands I, et al. A mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). Microbiology, 1998, 144 (11):3195.

[6]Mantegani P, Piana F, Codecasa L, et al. Comparison of an in-house and a commercial RD1-based ELISPOT-IFN-gamma assay for the diagnosis of Mycobacterium tuberculosis infection. Clinical Medicine & Research, 2006, 4(4):266.

[7]Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-Cell-based Assays for the Diagnosis of Latent Tuberculosis Infection: An Update. Annals of Internal Medicine, 2008, 149(3):177.

[8]Fan L, Chen Z, Hao X H, et al. Interferon-gamma release assays for the diagnosis of extrapulmonary tuberculosis: a systematic review and meta-analysis.Fems Immunology & Medical Microbiology, 2012, 65(3):456-66.

[9]Doberne D, Gaur R L, Banaei N. Preanalytical delay reduces sensitivity of QuantiFERON-TB gold in-tube assay for detection of latent tuberculosis infection. Journal of Clinical Microbiology, 2011, 49(8):3061.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州市雷德生物科技有限公司

注册人住所：广州市高新技术产业开发区揽月路 80 号科技创新基地 D 区 701

生产地址：广州市高新技术产业开发区揽月路 80 号科技创新基地 D 区 7 楼、G 区 6 楼

生产许可证编号：

售后服务单位名称：

电话：

传真：

邮箱：

网址：

邮编：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期及修改日期】