

受理号：CSZ2100192

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：曲霉菌属、新型隐球菌及耶氏肺孢子菌核酸
检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：北京卓诚惠生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

四、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	13
四、产品受益风险判定	14
综合评价意见	17

基本信息

一、申请人名称

北京卓诚惠生生物科技股份有限公司

二、申请人住所

北京市昌平区科技园区生命园路 29 号 2 层 A204 室

三、生产地址

北京市昌平区沙河镇昌平路 97 号 5 檐 C 门 101、6 檐 504、
7 檐 304

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品主要组成成分见下表：

试剂组分	主要成分	规格及数量	
		24人份	48人份
1.核酸扩增反应液	Tris-HCl, KCl, Mg ²⁺ , dN(U) TP Mix, Buffer 缓冲液, 耐热DNA 聚合酶, 尿嘧啶-DNA 糖基化酶	840 μL × 1 管	840 μL × 2 管
2.引物探针混合液	曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌及内标特异性基因的引物及探针	120 μL × 1 管	240 μL × 1 管
3.阴性对照	无核酸酶水	400 μL × 1 管	400 μL × 1 管
4.阳性对照	含曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌和内标基因片段的灭活工程菌	400 μL × 1 管	400 μL × 1 管

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人痰液样本中曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌的核酸 DNA。

本试剂用于肺部曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌真菌感染的辅助诊断，不能单独作为确诊的依据。

适用人群主要为免疫低下、免疫缺陷人群，其他人群应有肺部真菌感染相关指征。

真菌感染常见于免疫低下或缺陷人群，具有较高的发病率和死亡率，其临床症状表现不具有特异性，易被细菌、病毒等感染掩盖，临幊上致病菌包括曲霉菌属、隐球菌、耶氏肺孢子菌等，检测多重真菌可用于辅助临幊诊断。

本试剂盒的检测结果仅供临幊参考，对患者的临幊诊治应结合其症状、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

该产品检测阳性不能确定标本中有活病原菌，检测结果应结合其他临幊诊断综合判断。

本产品对于曲霉菌属的检测不能确认具体菌种，如有必要临幊应考虑对于曲霉菌属阳性结果进一步确认感染的菌种。

（三）产品包装规格

24人份/盒，48人份/盒

（四）产品检验原理

本试剂盒分别选取曲霉菌属 18s rRNA 基因、新型隐球菌 ITS 基因和耶氏肺孢子菌 mtLSU rRNA 基因中保守的区域设计特异性引物和探针，在样本 DNA 核酸纯化之后采用荧光 PCR 对 DNA 进行检测。

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 技术，PCR 扩增过程中，探针与模板结合，其 5' 端报告基因被 Taq 酶 5' → 3' 外切核酸酶活性切断，使报告基因远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，并计算出样本 Ct 值（每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数）。曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌荧光标记分别为 FAM、VIC、CY5。

本试剂盒反应体系含有 dUTP-UDG 防污染措施，避免操作产生的假阳性结果；采用内源性内标质控体系，通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程进行监控，避免检测结果的假阴性，内标基因选择人源管家基因 RP，荧光标记为 ROX。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：引物、探针、dN (U) TP Mix、PCR 扩增体系、UDG 酶、灭活工程菌。这些原材料均为外购方式获得。引物、探针为申请人自行设计后由专业合成公司合成。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。

2.企业参考品和质控品的设置情况

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品以及精密度参考品。

阳性参考品P1~P18为试剂盒覆盖的3种阳性病原菌。其中P1~P8为不同菌种曲霉菌属阳性，其他病原体阴性样本；P9~P16为不同型别新型隐球菌阳性，其他病原体阴性样本；P17~P18为耶氏肺孢子菌阳性，其他病原体阴性样本。

阴性参考品N1~N16为种属相近的或引起症状相似的病原菌，分别为白色念珠菌、热带念珠菌、甲型流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、肺炎支原体、肺炎链球菌、百日咳杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎克雷伯氏菌、结核分枝杆菌、少根根霉、伞枝犁头霉、近平滑念珠菌、卡氏肺孢子菌、兔源肺孢子菌阳性样本。

最低检出限参考品L1~L9为试剂盒覆盖的3种阳性病原菌，其中L1~L4为不同菌种曲霉菌属样本；L5~L8为不同型别新型隐球菌样本；L9为耶氏肺孢子菌样本。

精密度参考品R1~R3为试剂盒覆盖的3种阳性病原菌混合样本，R0为生理盐水。

试剂盒包含阳性对照品和阴性对照品各1支，用于检测过程的质量控制。阳性对照品为添加有内标基因片段的灭活工程菌，

覆盖试剂盒可检出的所有目标病原菌，阴性对照品为无核酸酶水。

（二）生产工艺及反应体系研究

通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人对样本中可能存在的抑制因素进行了测试，并对样本核酸提取方法进行了研究；同时对引物、探针、Taq酶、UDG酶、dN(U)TP、Mg离子等的浓度和体积进行了优化；对反应条件进行优化，包括样本采集处理、UDG酶消化时间、变性时间、退火和延伸温度、循环数的选择等研究，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：核酸提取性能、准确性、精密度、最低检出限、特异性、包容性、竞争性干扰研究等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品，在适用机型 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上的性能评估资料。

在核酸提取效率研究中，比较评估了产品配套使用的核酸提取试剂盒的提取性能，采用不同的提取试剂及痰液消化液，使用不同浓度、型别/菌种的临床阳性样本进行提取效率、核酸纯度、重复性、室间精密度、最低检出限的研究，结果表明配套使用的痰液消化液和核酸提取试剂盒可满足产品使用需求。

在准确度研究中，申请人采用三批成品试剂盒，检测企业阳性参考品和阴性参考品，以及不同浓度、不同型别/菌种临床阳性样本和阴性样本。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，申请人采用三批成品试剂盒，对精密度参考品以及不同浓度、不同型别/菌种的阳性临床样本及阴性样本，进行20天的重复性检测，评估了日内/批内、日内/批间、批内/日间、批间/日间、室间/不同操作者之间的精密度。结果显示：Ct值变异系数（CV，%）均≤5.0%，试剂盒精密度良好。

在最低检出限研究中，申请人采用三批成品试剂盒，检测系列浓度梯度样本，研究样本包含目标菌的常见型别/菌种，将达到95%阳性检出率的最低浓度水平作为确定的最低检出限，并进行最低检出限验证。最终确定该产品各靶标最低检出限定为曲霉菌属、新型隐球菌及耶氏肺孢子菌均为1500 copies/mL。

在包容性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对收集不同地区的各目标菌的阳性样本及不同型别病原体进行检测。曲霉菌属包括：烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、米曲霉、土曲霉、构巢曲霉；新型隐球菌包括：新生隐球菌新生变种、新生隐球菌格鲁比变种、新生与格鲁比变种杂合体、格特隐球菌；耶氏肺孢子菌。结果表明试剂盒对不同菌种及不同型别的病原体均能

正确检出，试剂盒包容性良好。

在特异性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，选取与检测目标核酸序列具有同源性病原体、HIV、恶性肿瘤等免疫力低下患者常见感染病原微生物、近源菌、易引起相同或相似的临床症状、采样部位正常寄生或易并发的其他病原体作为交叉反应研究对象。结果表明：本试剂盒与白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、毛霉、少根根霉、伞枝犁头霉、总状毛霉、马尔尼菲青霉菌、斜卧青霉、草酸青霉、卡氏肺孢子菌、兔肺孢子菌、瓦氏肺孢子菌、鼠肺孢子菌、无壳散囊菌、荚膜组织包浆菌、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、唾液链球菌、肺炎链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、表皮葡萄球菌、流感嗜血杆菌、纹带棒杆菌、大肠杆菌、阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌、乳酸杆菌、鲍曼不动杆菌、无毒结核分枝杆菌、卡他莫拉菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、嗜肺军团菌、洋葱伯克霍尔德菌、诺卡菌、粘质沙雷菌、奈瑟氏菌属、百日咳杆菌、肺炎衣原体、肺炎支原体、鹦鹉热衣原体、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、偏肺病毒、肠道病毒、冠状病毒、博卡病毒、水痘带状病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、HIV、肺癌患者样本验证均无交叉反应。

在干扰性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，进行了内源/外源干扰物质研究及竞争性干扰研究，对样本中可能含有的干扰物质分别进行评价，包括血液、唾液在样本中的浓度不高于 15% 时，对检测结果无显著影响；针对治疗真菌感染或其他相关疾病的常见药物如：两性霉素 B (4mg/L)、卡泊芬净 (12.4mg/L)、米卡芬净 (13 μg/mL)、伏立康唑 (4 μg/mL)、伊曲康唑 (0.5 μg/mL)、氟胞嘧啶 (40 μg/mL)、他克莫司 (15 μg/L)、麦考酚酸 (30mg/L)、替诺福韦 (1mg/L)、地塞米松 (20ng/mL)、甲强龙 (500ng/mL)、多西他赛 (10 μg/mL)、培美曲塞 (200 μg/mL)、二甲双胍 (3 μg/mL)、阿卡波糖 (100 μg/mL)、PD-1 (60 μg/mL) 进行验证，结果显示内源/外源干扰物质不会对产品检测结果产生干扰。

在竞争性干扰研究中，三种目标菌当一种病原体在最低检出限浓度附近，其他病原体为高浓度时，各靶标之间不会产生竞争干扰。故试剂盒检测结果不受内源/外源干扰物质及竞争性干扰影响。

（四）阳性判断值研究

对收集的临床样本进行检测，包括各病原菌的不同型别/菌种、不同浓度的临床样本，获得原始的 Ct 值用于制定各指标的阳性判断值。对于含有阳性和阴性数据的指标，采用 ROC 曲线

法制定各指标的阳性判断值。并进行了阳性判断值的验证，根据验证结果最终确定了试剂盒的阳性判断值：曲霉菌属 $C_t < 33.7$ 为阳性；新型隐球菌及耶氏肺孢子菌 $C_t \leq 36$ 为阳性。

(五) 稳定性研究

对本产品的实时稳定性、开瓶稳定性、反复冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性进行了研究，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：试剂盒储存于 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 。分别于不同时间点，对其阴�性符合率、最低检出限和精密度进行考察。结果表明试剂盒在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，试剂盒有效期为 12 个月。

开瓶稳定性：试剂盒开瓶后按照规定储存在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ ，试剂开瓶后分别于不同时间，对其阴�性符合率、最低检出限和精密度进行考察。结果表明试剂盒开瓶后在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存，试剂盒有效期为 15 天。

反复冻融稳定性：试剂盒按照规定储存在 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ ，试剂盒冻结后再取出置于室温解冻，如此反复冻融数次。将冻融后的产品在不同时间点进行阴�性符合率、最低检出限、精度的考察。结果表明，试剂使用过程中冻融次数不得超过 7 次。

运输稳定性：随机各抽取 3 批多盒试剂，采用模拟运输的方法进行研究。运输目的地选择吉林省长春市以及广东省广州

市到达目的地后折返。运输结束后将试剂放置至有效期末，按技术要求对产品外观、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、精密度和最低检出限指标进行检测，检测结果均符合技术要求；

对样本和核酸保存稳定性及冻融次数进行了研究。结果表明：样本在 2℃~8℃条件下可以保存 72 小时，-20℃±5℃条件下可以保存 12 个月，-90℃~-70℃条件下可保存 24 个月。冻存的样本反复冻融后应充分混匀，避免 5 次以上反复冻融。提取后的核酸可于-20℃±5℃条件下保存 12 个月，反复冻融不超过 5 次。

三、临床评价概述

申请人在首都医科大学附属北京地坛医院、蚌埠医学院第一附属医院、中国医学科学院北京协和医院、重庆市公共卫生医疗救治中心共四家机构完成了临床试验。

采用试验体外诊断试剂分别与 Sanger 测序法、真菌分离培养鉴定/镜检法和肺真菌病临床诊断参考标准进行比较研究，确认本产品的临床性能。入组病例共计 594 例，主要包括免疫缺陷及免疫低下同时有肺部感染症状的病例，或有肺部真菌感染相关指征的病例。

与 Sanger 测序法的对比试验中，曲霉菌属共计入组阳性样本 174 例（包含烟曲霉、黄曲霉等主要菌种），阴性样本 419

例，试验结果显示，阳性符合率为 100% (95CI: 97.90%, 100%)，阴性符合率为 98.81% (95CI: 97.24%, 99.61%)；新型隐球菌共计入组阳性样本 76 例，阴性样本 518 例，试验结果显示，阳性符合率为 100% (95CI: 95.26%, 100%)，阴性符合率为 99.61% (95CI: 98.61%, 99.95%)；肺孢子菌共计入组阳性样本 141 例，阴性样本 450 例，试验结果显示，阳性符合率为 99.29% (95CI: 96.11%, 99.98%), 阴性符合率为 98.67% (95CI: 97.12%, 99.51%)。

与真菌分离培养鉴定/镜检法的比较研究中，曲霉菌属共计入组培养鉴定阳性样本 45 例，试验体外诊断试剂阳性检出率 100%；新型隐球菌共计入组培养鉴定阳性样本 34 例，试验体外诊断试剂阳性检出率 100%；肺孢子菌共计入组镜检法阳性样本 35 例，试验体外诊断试剂阳性检出率 100%。

与肺真菌病临床诊断参考标准的比较研究中，曲霉菌属共计入组确诊和临床诊断病例 87 例，试验体外诊断试剂阳性检出率 93.10%；新型隐球菌共计入组确诊和临床诊断病例 34 例，试验体外诊断试剂阳性检出率 88.24%；肺孢子菌共计入组确诊和临床诊断病例 62 例，试验体外诊断试剂阳性检出率 70.97%。

综上，试验体外诊断试剂临床性能能够满足临床需求。

四、产品受益风险判定

产品受益：本产品用于体外定性检测人痰液样本中曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌的核酸 DNA。用于肺部曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌真菌感染的辅助诊断。目前临
床肺真菌病诊断方法较为缺乏，特别是肺孢子菌病原学诊
断方法缺乏，本产品可为临床提供更多辅助诊断的信息，特别
是对于免疫抑制患者，有一定的诊断参考价值。

产品风险：本产品检测样本类型为痰液，对于肺真菌病的
诊断，痰液样本类型的灵敏度和特异性具有一定的局限性，本
产品检测结果仅能报告痰液样本中有相关病原体核酸。

以上风险在说明书中进行了相关提示，同时考虑痰液样本
可及性较好，样本采集对于受试者风险较小，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，认为该产品上
市带来的受益大于风险。

本产品根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械
产品的安全风险分析方式，对本产品进行风险分析。

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.本试剂用于肺部曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌真
菌感染的辅助诊断，不能单独作为确诊的依据。

适用人群主要为免疫低下、免疫缺陷人群，其他人群应有

肺部真菌感染相关指征。

2.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。

3.该产品检测阴性不能确定标本中有活病原菌,检测结果应结合其他临床诊断综合判断。

4.本产品对于曲霉菌属的检测不能确认具体菌种,如有必要临床应考虑对于曲霉菌属阳性结果进一步确认感染的菌种。

5.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

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 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，经系统评价后，建议准予注册。

2023 年 3 月 9 日

附件：产品说明书

曲霉菌属、新型隐球菌及耶氏肺孢子菌核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：曲霉菌属、新型隐球菌及耶氏肺孢子菌核酸检测试剂盒（PCR 荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒，48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人痰液样本中曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌的核酸 DNA。

本试剂用于肺部曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌真菌感染的辅助诊断，不能单独作为确诊的依据。

适用人群主要为免疫低下、免疫缺陷人群，其他人群应有肺部真菌感染相关指征。

真菌感染常见于免疫低下或缺陷人群，具有较高的发病率和死亡率，其临床症状表现不具有特异性，易被细菌、病毒等感染掩盖，临幊上致病菌包括曲霉菌属、隐球菌、耶氏肺孢子菌等，检测多重真菌可用于辅助临幊诊断。

本试剂盒的检测结果仅供临幊参考，对患者的临幊诊治应结合其症狀、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

该产品检测阳性不能确定标本中有活病原菌，检测结果应结合其他临幊诊断综合判断。

本产品对于曲霉菌属的检测不能确认具体菌种，如有必要临幊应考虑对于曲霉菌属阳性结果进一步确认感染的菌种。

【检验原理】

本试剂盒分别选取曲霉菌属 18s rRNA 基因、新型隐球菌 ITS 基因和耶氏肺孢子菌 mtLSUrRNA 基因中保守的区域设计特异性引物和探针，在样本 DNA 核酸纯化之后采用荧光 PCR 对 DNA 进行检测。

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 技术，PCR 扩增过程中，探针与模板结合，其 5' 端报告基团被 Taq 酶 5'-3' 外切核酸酶活性切断，使报告基团远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，并计算出样本 Ct 值（每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数）。曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌荧光标记分别为 FAM、VIC、CY5。

本试剂盒反应体系含有 dUTP-UDG 防污染措施，避免操作产生的假阳性结果；采用内源性内标质控体系，通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程进行监控，避免检测结果的假阴性，内标基因选择人管家基因 RP，荧光标记为 ROX。

【主要组成成分】

序号	组分名称	组成成分	规格及数量	
			24 人份	48 人份
1	核酸扩增反应液	Tris-HCl, KCl, Mg ²⁺ , dN (U) TP Mix, Buffer 缓冲液，耐热 DNA 聚合酶，尿嘧啶-DNA 糖基化酶	840 μL ×1 管	840 μL ×2 管
2	引物探针混合液	曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌及内标特异性基因的引物及探针	120 μL ×1 管	240 μL ×1 管

3	阴性对照	无核酸酶水	400 μL ×1 管	400 μL ×1 管
4	阳性对照	含曲霉菌属、新型隐球菌、耶氏肺孢子菌和内标基因片段的灭活工程菌	400 μL ×1 管	400 μL ×1 管

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

需要但未提供试剂：

序号	名称	生产企业	备案号
1	核酸提取试剂	北京卓诚惠生生物科技股份有限公司	京昌械备 20200008 号
2	核酸提取试剂	北京卓诚惠生生物科技股份有限公司	京昌械备 20200083 号

【储存条件及有效期】

-20±5℃ 避光保存，有效期为 12 个月。

开瓶后置于 2-8℃ 保存，有效期为 15 天。避免反复冻融（冻融次数不得超过 7 次）。

采用泡沫箱加干冰密封运输或冷链运输，运输温度不高于-10℃，运输时间不宜超过 5 天。

生产日期和失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1、样本采集

采用无菌痰液样本收集盒。患者留取的痰液样本，应由检验人员或经培训的专业人员目视检查样本质量：样本量一般在 3~5mL，样本形状为干酪痰、褐色血痰或含少量新鲜血液的血痰、粘液痰等为合格的样本；痰液样本不合格，如实际为唾液样本，应在专业人员的进一步指导取样后重新送检。

2、样本保存条件

样本应尽快检测，2~8℃ 条件下可以保存 72 小时，-20±5℃ 条件下可以保存 12 个月，在-90~-70℃ 条件下可保存 24 个月。冻存的样本反复冻融后应充分混匀，避免 5 次以上反复冻融。提取后的核酸可于-20±5℃ 条件下保存 12 个月，反复冻融不超过 5 次。

【检验方法】

将试剂盒所需组分取出，室温融化，短暂震荡，瞬时离心。

一、样本处理（样本处理区）

1、样本前处理

NaOH 法：将痰液样本加到 50mL 带螺旋盖的试管中，视痰液的粘稠度，加入 1~2 倍体积（1 倍体积约 3~5mL）4% NaOH 消化液于痰液管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡 1 分钟，室温于生物安全柜内放置 15~20 分钟，使痰液充分液化。

DTT 法：将痰液样本加到 50mL 带螺旋盖的试管中，视痰液的粘稠度，加入 1~2 倍体积（1 倍体积约 3~5mL）0.1% DTT 消化液于痰液管中，拧紧螺旋盖，涡旋振荡 1 分钟，室温于生物安全柜内放置 30 分钟，使痰液充分液化。

任选其中一种方法，均可用于样本前处理。

2、样本提取

NMPA 器审中心技术审评报告公开
www.cmde.org.cn

使用推荐的核酸提取试剂，取阳性对照、阴性对照和处理后的待测样本各 200 μL 进行提取，具体提取步骤请参照相应提取试剂说明书。

二、试剂配制（试剂准备区）

确定反应数 N, N=待检样本数(n)+阳/阴性对照(2)+1。计算加到反应混合物中的各个试剂的量，计算方法如下表。取无菌离心管配制反应体系，试剂全部加入后震荡混匀，瞬时离心，分装 40 μL 至各 PCR 反应管中。

试剂盒组分	反应体系
核酸扩增反应液	35 μL×N
引物探针混合液	5 μL×N
总体积	40 μL×N

体系分装：将上述反应液混匀离心后，按照每管 40 μL 分装于荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

三、加样（样本处理区）

加入 10 μL 提取的样本 DNA、阳性对照和阴性对照溶液到 PCR 反应管中，不要混匀，盖紧 PCR 反应管管盖，瞬时离心将管壁上液体全部甩到管底，然后立即进行 PCR 扩增反应。

四、PCR 扩增检测（扩增检测区）

检测通道：曲霉菌属选择 FAM 通道，新型隐球菌选择 VIC 通道，耶氏肺孢子菌选择 CY5 通道，内标选择 ROX 通道。ABI 7500 仪器中“Quencher Dye”和“Passive Reference”均设置为 None。按照样本对应顺序设置阳性对照（Positive Control）、阴性对照（Negative Control）和样本（Unknown），并设置样本名称。

序号	阶段	温度 (°C)	时间	循环数
1	预反应	50	2 分钟	1
		95	5 分钟	
2	变性	95	15 秒	40
	退火，延伸，采集信号	60	45 秒	
3	仪器冷却	12	1 分钟	1

五、阈值设定

PCR 反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时，基线设定在 3~15 之间，阈值线设定视不同仪器相对荧光值而定。单击分析即可得到各检测样本的 Ct 值。阈值设定原则为阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

六、实验有效性判断

- (1) 阳性对照：FAM、VIC、CY5 和 ROX 通道有 S 型扩增曲线，阳性对照 Ct 值 ≤ 33.7 。
- (2) 阴性对照：FAM、VIC、CY5 和 ROX 通道无 S 型扩增曲线，Ct 显示为 Undetermined。

注：条件 (1) (2) 必须在同一实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值】

检测样本曲霉菌属 Ct ≤ 33.7 为阳性，Ct > 33.7 为阴性；检测样本新型隐球菌及耶氏肺孢子菌 Ct ≤ 36 为阳性，Ct > 36 为阴性。

【检验结果的解释】

- 1、如果内标通道出现 S 型扩增曲线，并具备如下条件，判为阳性：

通道	Ct 值	结果判读
FAM	Ct ≤ 33.7	曲霉菌属阳性
VIC	Ct ≤ 36	新型隐球菌阳性
CY5	Ct ≤ 36	耶氏肺孢子菌阳性

注：对于 FAM、VIC 和 CY5 通道具有明显 S 型扩增曲线的样本，其内标通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线，也可能因为高浓度样本的抑制作用而导致内标通道无 S 型扩增曲线，属正常情况。

- 2、如果内标通道出现 S 型扩增曲线 (Ct ≤ 36)，同时 FAM、VIC 和 CY5 通道检测无 S 型扩增曲线 (或曲霉菌属 Ct > 33.7 ，新型隐球菌及耶氏肺孢子菌 Ct > 36)，则判定对应目标结果为阴性。
- 3、如果 FAM、VIC 和 CY5 通道及内标通道均未出现明显的 S 型扩增曲线 (或曲霉菌属 Ct > 33.7 ，新型隐球菌、耶氏肺孢子菌及内标 Ct > 36)，原因分析及建议：

- 3.1 未采集到足够的人细胞，建议重新采样检测；
- 3.2 核酸提取过程异常，导致核酸损失，建议重新提取检测；
- 3.3 样本中存在抑制 PCR 反应的物质，可对样本进行稀释后检测。
- 4、如检测的样本类型为培养物或工程菌等，对内标的检测可不做要求。

【检验方法的局限性】

- 1、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。
- 2、本试剂盒中内标靶基因为人的管家基因，实验室的耗材容易被人体表面携带的核酸污染，可能导致试剂盒中空白对照的 ROX 通道有扩增。
- 3、实验区域样本或者核酸污染有可能造成假阳性结果。
- 4、不合理样本采集、转运及处理，检测样本中被检测核酸浓度含量低于最低检出限时均有可能导致假阴性结果。
- 5、未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子，可能会导致假阴性结果。

【产品性能指标】

- 1、曲霉菌属、新型隐球菌和耶氏肺孢子菌最低检出限：1500 copies/mL。
- 2、精密性：使用 3 批试剂盒连续 20 天，每天由 2 名操作人员在两个不同的实验室对企业精密度参考品及临床样本进行重复检测，日内/批内、日内/批间、批内/日间、批间/日间、室间/不同操作者精密度 Ct 值变异系数 (CV, %) 均 $\leq 5.0\%$ ，重复性良好。
- 3、对企业阳性参考品和阴性参考品的检测：检测 18 份企业阳性参考品阳性符合率 (+/+) 为 18/18；16 份企业阴性参考品阴性符合率 (-/-) 为 16/16。
- 4、交叉反应：本试剂盒白色念珠菌、热带念珠菌、光滑念珠菌、近平滑念珠菌、克柔念珠菌、毛霉、少根根霉、伞枝犁头霉、总状毛霉、马尔尼菲青霉菌、斜卧青霉、草酸青霉、卡氏肺孢子菌、兔肺孢子菌、瓦氏肺孢子菌、鼠肺孢子菌、无壳散囊菌、荚膜组织包浆菌、金黄色葡萄球菌、化脓链球菌、唾液链球菌、肺炎链球菌、粪肠球菌、屎肠球菌、表皮葡萄球菌、流感嗜血杆菌、纹带棒杆菌、大肠杆菌、阴沟肠杆菌、柠檬酸杆菌、乳酸杆菌、鲍曼不动杆菌、无毒结核分枝杆菌、卡他莫拉菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯氏菌、嗜肺军团菌、洋葱伯克霍尔德菌、诺卡菌、粘质沙雷菌、奈瑟氏菌属、百日咳杆菌、肺炎衣原体、肺炎支原体、鹦鹉热衣原体、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、偏肺病毒、肠道病毒、冠状病毒、博卡病毒、水痘带状病毒、EB 病毒、巨细胞病毒、HIV、肺癌患者样本验证均无非特异扩增。
- 5、干扰物质：血液、唾液在样本中的浓度不高于 15% 时，对检测结果无显著影响；针对治疗真菌感染或其他相关疾病的常见药物如：两性霉

素 B (4mg/L)、卡泊芬净 (12.4mg/L)、米卡芬净 (13 μ g/mL)、伏立康唑 (4 μ g/mL)、伊曲康唑 (0.5 μ g/mL)、氟胞嘧啶 (40 μ g/mL)、他克莫司 (15 μ g/L)、麦考酚酸 (30mg/L)、替诺福韦 (1mg/L)、地塞米松 (20ng/mL)、甲强龙 (500ng/mL)、多西他赛 (10 μ g/mL)、培美曲塞 (200 μ g/mL)、二甲双胍 (3 μ g/mL)、阿卡波糖 (100 μ g/mL)、PD-1 (60 μ g/mL) 进行验证, 未对检测结果产生显著影响。

6、兼容性: 对曲霉菌属中烟曲霉、黄曲霉、黑曲霉、米曲霉、土曲霉、构巢曲霉; 耶氏肺孢子菌; 新生隐球菌格鲁比变种、新生隐球菌新生变种、新生与格鲁比变种杂合体、格特隐球菌进行验证, 均正常检出。

7、临床试验结果: 本试剂在四家临床试验机构完成了临床试验, 与 Sanger 测序方法比对研究, 曲霉菌属共完成 593 例痰液样本的临床试验, 阳性符合率为 100.00%, 阴性符合率为 98.81%; 总体符合率为 99.16%; 新型隐球菌共完成 594 例痰液样本的临床试验, 阳性符合率为 100.00%, 阴性符合率为 99.61%, 总体符合率为 99.66%; 耶氏肺孢子菌共完成 591 例痰液样本的临床试验, 阳性符合率为 99.29%, 阴性符合率为 98.67%, 总体符合率为 98.82%。与真菌分离培养鉴定/镜检法对比研究, 曲霉菌属共计入组分离培养鉴定阳性样本 45 例, 阳性检出率 100%; 新型隐球菌共计入组分离培养鉴定阳性样本 34 例, 阳性检出率 100%; 耶氏肺孢子菌共计入组镜检法阳性样本 35 例, 阳性检出率 100%; 与临床参考标准比对研究, 曲霉菌属共计入组确诊/临床诊断病例 87 例, 阳性检出率为 93.10%; 新型隐球菌共计入组确诊/临床诊断病例 34 例, 阳性检出率为 88.24%; 耶氏肺孢子菌共计入组确诊/临床诊断病例 62 例, 阳性检出率为 70.97%。

【注意事项】

1. 开始检测前请仔细阅读本说明书, 本品仅用于体外诊断。
2. 检测结果的临床解读应结合其他临床诊断综合判断。
3. 本试剂盒不含有活性人源或动物源性物质, 试剂盒中的阳性质控品是灭活的工程菌, 无传染性, 但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
4. 使用本产品时, 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备, 有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。对操作人员进行培训, 严格按照说明书要求进行操作。
5. 样本处理在生物安全柜内进行操作, 防止污染环境和保护操作者。
6. 实验后的废弃物, 如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。加样本吸头用后打入盛有 1% 次氯酸的废物缸里。实验完毕后使用 1% 次氯酸或 75% 乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面, 然后紫外灯照射 25-30 分钟。

【参考文献】

1. 《病原微生物实验室生物安全通用准则 (WS233-2017)》
2. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发 (2010) 194 号
3. 《医疗废物管理条例》中华人民共和国国务院令 (第 380 号)
4. Travis H, Peter C. Iwen, et al. Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed Spacer Regions 1 and 2[J]. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Apr. 2000, p. 1510–1515.
5. Thomas G. Mitchell, et al. Unique Oligonucleotide Primers in PCR for Identification of *Cryptococcus neoformans*[J]. JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, Jan. 1994, p. 253-255.

6. Wakefield AE, Pixley FJ, Banerji S, et al. Detection of *Pneumocystis carinii* with DNA amplification[J]. MEDICAL SCIENCE, 1990;336:451-453.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 北京卓诚惠生生物科技股份有限公司

住所: 北京市昌平区科技园区生命园路 29 号 2 层 A204 室

联系方式:

售后服务单位名称:

联系方式:

生产地址: 北京市昌平区沙河镇昌平路 97 号 5 幢 C 门 101、6 幢 504、7 幢 304

【医疗器械生产许可证编号】

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书批准及修改日期】