

受理号：CSZ2400504

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳
杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：深圳市亿立方生物技术有限公司

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
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

基本信息

一、申请人名称

深圳市亿立方生物技术有限公司

二、申请人住所

深圳市坪山新区坪山办事处六联社区浪尾村宝山路 16 号

B 栋 9 楼 01 区

三、生产地址

深圳市坪山新区坪山办事处六联社区浪尾村宝山路 16 号
B 栋 9 楼 01 区；深圳市坪山区坪山街道办事处六联社区浪尾
村宝山路 16 号 C 栋 6 楼 02 区

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

试剂盒组成

组成成分	24 人份/盒		48 人份/盒		96 人份/盒		生化组成
	规格	数量	规格	数量	规格	数量	
DNA 提取液	1.4 mL	1 管	1.4mL	2 管	1.4mL	4 管	NP-40、EDTA、Chelex -100、Triton X-100
百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌 PCR 反应液 A	375μL	1 管	750μL	1 管	1500μL	1 管	PCR 反应缓冲液、4 对引物、4 条探针、dN (U) TP
百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌 PCR 反应液 B	25μL	1 管	50μL	1 管	100μL	1 管	热启动 Taq 酶、UNG 酶
阴性质控品	400μL	1 管	400μL	1 管	400μL	1 管	生理盐水
阳性质控品	400μL	1 管	400μL	1 管	400μL	1 管	百日咳杆菌（耐药位点突变）、副百日咳杆菌培养物，和内参假病毒

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

(二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测人口咽拭子或鼻咽拭子样本中百日咳杆菌 DNA 及其耐药突变位点 23S rRNA 2047 (A: G)、以及副百日咳杆菌的 DNA。

百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) 能引起一种严重急性呼吸道传染病百日咳, 是严重威胁人类健康的主要传染病之一。百日咳临床特征为阵发性、痉挛性咳嗽, 并伴有深长的“鸡鸣”样吸气性吼声, 因接种疫苗影响, 百日咳存在不典型症状, 如未得到及时有效治疗, 病程可达数月。本病传染性强, 人群普遍易感, 其中尤以婴幼儿多见, 患儿年龄越小, 病情越重, 可因并发肺炎、脑病而死亡。百日咳的预防和治疗首选大环内酯类抗生素, 如红霉素、阿奇霉素等。近年来国内百日咳杆菌大环内酯类耐药率逐渐升高, 大量研究证实百日咳鲍特菌 23S rRNA 基因的 A2047G 突变与其对大环内酯类抗生素的耐药性有关, 即野生型菌株 (敏感株) 为 A2047 位点, 突变型菌株 (耐药株) 为 2047G 位点。副百日咳杆菌 (*Bordetella parapertussis*) 也可以引起类似百日咳症状的上呼吸道疾病, 但是其引起的症状轻微, 易与百日咳杆菌引起的百日咳疾病混淆。

本试剂盒检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据。

(三) 产品包装规格

24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术, 针对百日咳杆菌 IS110

基因、副百日咳杆菌 IS1001 基因组 DNA 的高度保守区，分别设计特异性引物和荧光探针。在 PCR 反应体系中，如果存在百日咳杆菌、副百日咳杆菌核酸时，PCR 反应得以进行并释放荧光信号，通过仪器采集和分析相应荧光通道的信号强度，即可实现对样本中百日咳杆菌、副百日咳杆菌核酸的定性检测。针对百日咳杆菌耐药突变位点 23S rRNA 2047 (A: G)，本试剂盒采用 ARMS-PCR 技术即设计一条能与突变位点完全互补的特异性扩增引物，特异性引物能与突变的靶标序列结合并能进行 PCR 扩增，但不能与未突变的靶标序列结合而无扩增，再通过 TaqMan 探针进行检测，即可通过荧光信号的有无判断 2047 位点突变与否。

本试剂盒反应体系中含有 dUTP-UNG 酶防污染体系，以避免假阳性结果；体系中还含有内参对照，以避免假阴性结果。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

主要原材料包括：引物、探针、Taq 酶、UNG 酶、dN(U)TP 等。

主要原材料均为外购。申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性试验等，筛选出合格供应商，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

申请人设置了企业参考品,包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、精密性参考品。

其中阴性参考品 8 份,由试剂盒检测范围外不同病原体阳性的灭活病原体培养物、生理盐水组成。阳性参考品 9 份,由不同型别和浓度水平的临床样本、灭活病原体培养物组成。检测限参考品 3 份,由不同型别的临床样本、灭活病原体培养物组成。精密性参考品 6 份,由不同型别的临床样本、灭活病原体培养物组成。

该产品设置了阴性质控品及阳性质控品,其中阳性质控品包含百日咳杆菌(耐药位点突变)、副百日咳杆菌培养物和内参假病毒;阴性质控品为生理盐水,用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

(二)生产工艺及反应体系研究

申请人通过功能性试验确定最佳的生产工艺及反应体系,包括:样本采集及处理、样本用量、试剂用量、反应条件确认等。

(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、精密度、最低检出限、分析特异性、包容性等。申请人提交了有效运行的质量

管理体系下生产的三批产品在适用机型上的性能评估资料。

在准确度研究中，申请人采用三批试剂盒检测临床样本，通过对比该产品与临床诊断结果的一致性来评估准确度，结果显示阴、阳性符合率均符合要求。

在精密度研究中，申请人采用三批试剂，分别对阴性、临界阳性和中阳性临床样本分别进行重复性和实验室内精密度、实验室间精密度研究。结果显示，试剂盒精密度符合要求。

在最低检出限的研究中，申请人采用三批试剂，通过梯度稀释不同来源的百日咳杆菌、副百日咳杆菌及耐药百日咳杆菌常见分型的临床样本进行检测，以检出率 $\geq 95\%$ 时所对应的浓度水平作为试剂盒的最低检出限，并进行最低检出限验证。最终确定本试剂盒百日咳杆菌和副百日咳的最低检出限浓度均为 500 copies/mL；百日咳耐药突变位点的最低检出限浓度为 1000 copies/mL。

分析特异性研究包括交叉反应研究和干扰物质研究。

在交叉反应研究中，对试剂盒检测范围内和试剂盒检测范围外的病原体进行交叉反应验证。结果显示，本试剂盒可检测的病原体之间无交叉反应。与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体，包括甲型 H1N1，甲型 H3N2，甲型 H5N1，甲型 H7N9，乙型流感病毒（Victoria），乙型流感病毒（Yamagata），

博卡病毒，单纯疱疹病毒 1 型，肠道病毒，腺病毒 1 型，腺病毒 3 型，腺病毒 7 型，SARS 冠状病毒，诺如病毒，肺炎链球菌，奈瑟氏菌属，烟曲霉，卡他莫拉菌，副流感病毒 1 型，副流感病毒 2 型，副流感病毒 3 型，水痘带状疱疹病毒，麻疹病毒，冠状病毒 NL63，MERS 冠状病毒，肺炎衣原体，肺炎克雷伯菌，肺孢子菌，金黄色葡萄球菌，白色念珠菌，新生隐球菌，乳酸杆菌属，巨细胞病毒，EB 病毒，流行性腮腺炎病毒，人偏肺病毒，轮状病毒，肺炎支原体，化脓性链球菌，流感嗜血杆菌，结核分枝杆菌，光滑念珠菌，唾液链球菌，棒状杆菌属，呼吸道合胞病毒 B 型，霍氏鲍特菌，支气管鲍特菌，表皮葡萄球菌，嗜肺军团菌，幽门螺旋杆菌，肺炎支原体 23S rRNA A2063G 突变，肺炎支原体 23S rRNA A2064G 突变，幽门螺旋杆菌 23S rRNA A2142G 突变，幽门螺旋杆菌 23S rRNA A2142C 突变，幽门螺旋杆菌 23S rRNA A2143G 突变无交叉反应。

在干扰试验中，申请人对对样本中可能存在的内源性干扰物和外源性干扰物进行了研究，结果显示，在所测试的浓度范围内的纯化粘蛋白（8g/L）、人血液（5%）、脓液（5%）、苯福林（100 μ g/mL）、羟甲唑啉（150 μ g/mL）、氯化钠（含防腐剂）（60 μ g/mL）、倍氯米松（200 μ g/mL）、地塞米松（200 μ g/mL）、曲安奈德（150 μ g/mL）、布地奈德（256 μ g/mL）、莫

米松 (200 $\mu\text{g/mL}$)、氟替卡松 (20 $\mu\text{g/mL}$)、苯佐卡因 (2.5 mg/mL)、薄荷脑 (4 mg/mL)、扎那米韦 (10 mg/mL)、利巴韦林 (2.0 mg/mL)、奥司他韦 (5 mg/mL)、帕拉米韦 (2 mg/mL)、莫匹罗星 (10 mg/mL)、妥布霉素 (4 $\mu\text{g/mL}$)、红霉素 (50 mg/mL)、罗红霉素 (7.5 mg/mL)、阿奇霉素 (100 mg/mL)、氟尼缩松 (150 $\mu\text{g/mL}$) 和盐酸组胺 (100 $\mu\text{g/mL}$) 对本试剂盒的检测结果显示无干扰。

在微生物干扰性能评估中, 使用一种低浓度的目标病原体 和一种检测范围外的高浓度病原体混合感染设置, 评估病原体和常见混合感染病原体的干扰, 结果显示, 同一样本中存在混合感染时不会对检测造成干扰。

包容性研究包括生物信息学分析和临床样本验证两部分, 其中在临床样本验证中, 申请人采用三批试剂, 对不同来源的弱阳性浓度水平百日咳杆菌、副百日咳杆菌及耐药百日咳杆菌常见分型的临床样本进行检测, 检测结果均符合要求。

(四) 阳性判断值研究

申请人选取来自不同地区的 498 例临床样本进行研究, 采用受试者工作特征曲线 (ROC) 法计算得出百日咳杆菌、副百日咳杆菌、百日咳杆菌 23S rRNA 2047 位点突变的阳性判断值 (Ct 值) 为 40。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、使用稳定性、运输稳定性及样本稳定性进行了研究，确定了各种条件下试剂及样本的有效保存时间。

实时稳定性研究，申请人采用三批次试剂储存于 -18°C 以下条件下，在不同时间点按照技术要求进行检验，确定试剂可在 -18°C 以下避光保存，有效期 12 个月。

此外，申请人对产品的使用稳定性、运输稳定性和样本稳定性分别进行了研究，研究结果支持说明书声称。

三、临床评价概述

申请人在复旦大学附属儿科医院、湖南省儿童医院、天津市第二人民医院共三家临床试验机构开展了临床试验。入组受试者为具有百日咳杆菌、副百日咳杆菌感染相关症状/体征的人群。样本类型为人口咽拭子、鼻咽拭子。

针对百日咳杆菌，采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序及已上市同类产品进行比较研究。与 Sanger 测序比较，纳入统计分析 1146 例，包括口咽拭子 394 例，鼻咽拭子 752 例，其中阳性样本 544 例，阴性样本 602 例，阳性符合率为 100.00% (95%CI: 99.45%, 100.00%)，阴性符合率为 99.83% (95%CI : 99.06%, 99.97%)，总符合率为 99.91% (95%CI : 99.51%, 99.98%)。与

已上市同类产品对比,纳入统计分析 406 例,包括口咽拭子 155 例,鼻咽拭子 251 例,其中阳性样本 195 例,阴性样本 211 例,阳性符合率为 100.00% (95%CI : 98.07%, 100.00%), 阴性符合率为 100.00%(95%CI : 98.21%, 100.00%),总符合率为 100.00% (95%CI: 99.06%, 100.00%)。试验结果显示,试验体外诊断试剂与 Sanger 测序以及已上市同类产品的一致性较好。

针对百日咳杆菌耐药突变位点,采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序及药敏试验进行比较研究。与 Sanger 测序比较,纳入统计分析 545 例,包括口咽拭子 192 例,鼻咽拭子 353 例,其中阳性样本 380 例,阴性样本 165 例,阳性符合率为 100.00% (95%CI: 99.00%, 100.00%), 阴性符合率为 99.39% (95%CI: 96.65%, 99.89%),总符合率为 99.82%(95%CI: 98.97%, 99.97%)。466 例样本进行病原体分离培养,其中 211 例培养阳性样本进行药敏试验,阳性(耐药)110 例,阴性(敏感)101 例,灵敏度为 100.00% (95%CI: 96.63%, 100.00%), 特异度为 100.00% (95%CI: 96.34%, 100.00%)。试验结果显示,试验体外诊断试剂与 Sanger 测序以及药敏试验的一致性较好。

针对副百日咳杆菌,采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序及病原体分离培养进行对比研究。与 Sanger 测序比较,纳入统计分析 1146 例,包括口咽拭子 394 例,鼻咽拭子 752 例,其中

阳性样本 259 例, 阴性样本 887 例, 阳性符合率为 99.61% (95%CI: 97.85%, 99.93%), 阴性符合率为 100% (95%CI: 99.57%, 100%), 总符合率为 99.91% (95%CI: 99.51%, 99.98%)。与病原体分离培养结果进行比较, 纳入统计分析 466 例, 其中培养鉴定阳性样本 72 例, 培养鉴定阴性样本 394 例, 灵敏度为 100.00% (95%CI: 94.94%, 100.00%)。试验结果显示, 试验体外诊断试剂与 Sanger 测序以及病原体培养鉴定试验的一致性较好。

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

根据申请人提供的申报资料, 经综合评价, 目前认为该产品的受益大于风险, 但为保证产品使用安全, 基于对主要剩余风险的规避, 已在产品说明书中提示以下信息:

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 不得作为临床诊治的唯一依据, 对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检测及治疗反应等情况综合考虑。

2. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关, 任何步骤的失误可能导致假阴性结果。

3. 样本中模板浓度过低及样本中靶标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。

4. 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。

附件：产品说明书

附件

百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌核酸检测试剂盒

(PCR-荧光探针法)

产品使用说明书

【产品名称】

通用名称：百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒、96 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人口咽拭子或鼻咽拭子样本中百日咳杆菌 DNA 及其耐药突变位点 23S rRNA 2047 (A: G)、以及副百日咳杆菌的 DNA。

百日咳杆菌 (*Bordetella pertussis*) 能引起一种严重急性呼吸道传染病百日咳，是严重威胁人类健康的主要传染病之一。百日咳临床特征为阵发性、痉挛性咳嗽，并伴有深长的“鸡鸣”样吸气性吼声，因接种疫苗影响，百日咳存在不典型症状，如未得到及时有效治疗，病程可达数月。本病传染性强，人群普遍易感，其中尤以婴幼儿多见，患儿年龄越小，病情越重，可因并发肺炎、脑病而死亡。百日咳的预防和治疗首选大环内酯类抗生素，如红霉素、阿奇霉素等。近年来国内百日咳杆菌大环内酯类耐药率逐渐升高，大量研究证实百日咳鲍特菌 23S rRNA 基因的 A2047G 突变与其对大环内酯类抗生素的耐药性有关，即野生型菌株（敏感株）为 A2047 位点，突变型菌株（耐药株）为 2047G 位点。副百日咳杆菌 (*Bordetella parapertussis*) 也可以引起类似百日咳症状的上呼吸道疾病，但是其引起的症状轻微，易与百日咳杆菌引起的百日咳疾病混淆。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，针对百日咳杆菌 IS110 基因、副百日咳杆菌 IS1001 基因组 DNA 的高度保守区，分别设计特异性引物和荧光探针。在 PCR 反应体系中，如果存在百日咳杆菌、副百日咳杆菌核酸时，PCR 反应得以进行并释放荧光信号，通过仪器采集和分析相应荧光通道的信号强度，即可实现对样本中百日咳杆菌、副百日咳杆菌核酸的定性检测。针对百日咳杆菌耐药突变位点 23S rRNA 2047 (A: G)，本试剂盒采用 ARMS-

PCR 技术即设计一条能与突变位点完全互补的特异性扩增引物，特异性引物能与突变的靶标序列结合并能进行 PCR 扩增，但不能与未突变的靶标序列结合而无扩增，再通过 TaqMan 探针进行检测，即可通过荧光信号的有无判断 2047 位点突变与否。

本试剂盒反应体系中含有 dUTP-UNG 酶防污染体系，以避免假阳性结果；体系中还含有内参对照，以避免假阴性结果。

【主要组成成分】

表 1 百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳核酸检测试剂盒组成

组成成分	24 人份/盒		48 人份/盒		96 人份/盒		生化组成
	规格	数量	规格	数量	规格	数量	
DNA 提取液	1.4 mL	1 管	1.4mL	2 管	1.4mL	4 管	NP-40、EDTA、Chelex -100、Triton X-100
百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌 PCR 反应液 A	375μL	1 管	750μL	1 管	1500μL	1 管	PCR 反应缓冲液、4 对引物、4 条探针、dN (U) TP
百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌 PCR 反应液 B	25μL	1 管	50μL	1 管	100μL	1 管	热启动 Taq 酶、UNG 酶
阴性质控品	400 μL	1 管	400 μL	1 管	400 μL	1 管	生理盐水
阳性质控品	400 μL	1 管	400 μL	1 管	400 μL	1 管	百日咳杆菌（耐药位点突变）、副百日咳杆菌培养物，和内参假病毒

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

说明：1. 样本保存：使用生理盐水或样本保存液，样本保存液可使用广州阳普医疗科技股份有限公司生产的样本保存液（粤穗械备 20150192 号）。

2. 核酸提取试剂盒：使用深圳市亿立方生物技术有限公司生产的核酸提取试剂（粤深械备 20200805 号）。

【储存条件及有效期】

-18℃以下避光保存，有效期 12 个月。

反复冻融次数不得超过 10 次；开瓶次数不超过 10 次，开瓶后-18℃避光保存，不超过 1 个月。

生产日期和有效期至：见包装标签。

【适用仪器】

荧光定量 PCR 仪：Roche Cobas z480；Applied Biosystems7500；宏石 SLAN-96P/S。

【样本要求】

1. 适用样本类型：口咽拭子、鼻咽拭子。

2. 样本采集

推荐使用拭子的拭子头材质为尼龙植绒（聚酰胺）或聚酯纤维海绵，拭子杆材质为 ABS 或 PP（聚丙烯）。

鼻咽拭子采集：将一次性使用拭子插入鼻腔中轻轻转动并向鼻腔内推动拭子直至下鼻孔（离鼻孔约 2.0~2.5cm）受阻处摩擦数次，取出拭子，将拭子头浸入含 3 mL 生理盐水或样本保存液（非灭活型）的螺口塑料管中，尾部弃去，盖紧管盖。

口咽拭子采集：将一次性使用拭子从口腔插入咽喉中，以咽喉壁、扁桃体为中心，适度用力擦拭双侧咽扁桃体及咽后壁数次，同时应避免触及舌部，取出拭子，将拭子头浸入含 3 mL 生理盐水或样本保存液（非灭活型）的螺口塑料管中，尾部弃去，盖紧管盖。

3. 样本保存和运送：所采集的样本可立即用于测试，室温（15~25℃）保存不超过 24 小时，样本在 2-8℃ 条件下可保存 3 天，-18℃ 以下保存 12 个月，-70℃ 以下可保存 3 年，样本应避免反复冻融（冻融次数不超过 5 次）。

4. 样本运输：-18℃ 以下环境冷链运输，在途时间 7 天之内对结果无明显影响。

【检验方法】

1. PCR 试剂准备

1.1 将 PCR 反应液 A 放在室温条件下使之充分融解，应避免剧烈震荡反应液而产生气泡，可于室温融解后缓慢颠倒混匀或使用移液器吹打混匀，使用前将 PCR 反应液 A 和 B 分别离心，确保反应液集中在管底。

1.2 按下列组成配制 PCR 反应液（n 为反应管数）：PCR 反应液 A 为 15 μ L $\times$ n，PCR 反应液 B 为 1 μ L $\times$ n，将反应液 A 和 B 混匀，每管 16 μ L 分装到 PCR 反应管中并移至样本处理区。

$n = \text{待测样本数} + \text{阳性质控数} + \text{阴性质控数}$

2. 样本处理和核酸提取

2.1 处理方法 1

1) 吸取 1mL 待检样本溶液转至 1.5 mL 离心管中，12,000 rpm 离心 5 分钟；

2) 离心完成, 弃去上清 (约保留 10 μL 左右残留液体及沉淀)。每个样品加入 DNA 提取液 50 μL , 充分混匀, 于 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温处理 10 分钟;

3) 将处理后的溶液置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 低温或冰浴 2 分钟, 然后 12,000 rpm 离心 5 分钟, 留上清备用。

4) 质控品处理: 阴性质控品、阳性质控品分别取 10 μL , 加入 DNA 提取液 50 μL , 充分混匀, 100 $^{\circ}\text{C}$ 条件下恒温处理 10 分钟。冷却后, 12,000 rpm 离心 5 分钟, 备用。

2.2 处理方法 2

取 200 μL 样本液、阴性质控品和阳性质控品加至样品孔进行核酸提取。可使用深圳市亿立方生物技术有限公司生产的核酸提取试剂 (粤深械备 20200805 号), 或其他商业化产品对待测样本进行提取, 具体操作方法请参考试剂盒说明书。

3. 加样

在超净工作台中用带滤芯的枪头依次吸取 4 μL 已处理好的样本、阴性质控品和阳性质控品加到已经装有 PCR 反应液的 PCR 管中, 然后小心盖上市管盖。中速振荡数秒使反应液混匀, 再离心数秒, 确保最后的反应体系没有气泡, 将 PCR 反应管移至扩增检测区进行检测。

4. PCR 扩增 (参照各仪器说明书进行设置)

4.1 仪器检测通道选择: FAM 为百日咳杆菌的检测信号, Cy5 为百日咳耐药突变位点的检测信号, ROX 为副百日咳的检测信号, HEX/VIC 为内参检测信号。

4.2 将 PCR 反应管放入荧光 PCR 仪中进行扩增检测。

4.3 循环参数设定

表 2 PCR 扩增循环参数

序号	步骤	循环次数	温度 ($^{\circ}\text{C}$)	时间 (min:second)	收集荧光信号
1	UNG 酶反应	1	50	02:00	---
2	预变性	1	95	05:00	---
3	变性	45	95	00:10	---
	退火, 延伸, 荧光采集		55	00:30	√
4	仪器冷却 (可选)	1	37	00:20	---

注: ABI 7500 荧光定量 PCR 仪不选 ROX 校正, 淬灭基团选 None

5. 结果分析

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 值可设在 3~15，End 值可设在 5~20，调整空白对照（即阴性对照）的扩增曲线平直或低于阈值线；记录仪器自动分析计算出的样本 Ct 值。

6. 质控标准

6.1 阴性质控品：FAM、ROX、Cy5、HEX/VIC 检测通道无 Ct 值，无明显扩增曲线。

6.2 阳性质控品：FAM、ROX、Cy5、HEX/VIC 检测通道有明显、平滑的 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤34。

6.3 以上要求需在一次实验中同时满足，否则本次实验无效，应重新进行。

【阳性判断值】

选取来自不同地区的临床样本进行研究，采用受试者工作特征曲线（ROC）法计算得出百日咳杆菌、副百日咳杆菌、百日咳杆菌 23S rRNA 2047 位点突变的阳性判断值（Ct 值）为 40。

【检验结果的解释】

1. 阴阳性判断

待检样本按照下表进行结果判断

检测通道	检测型别	阳性判断值
FAM	百日咳杆菌	Ct 值≤40
ROX	副百日咳杆菌	Ct 值≤40
Cy5	百日咳杆菌 2047 位点突变	Ct 值≤40

1.1 若 FAM、ROX、Cy5 检测通道 Ct 值≤40，报告对应检测通道靶标阳性。

1.2 若 HEX/VIC 检测通道 Ct 值≤40，FAM、ROX、Cy5 检测通道无 Ct 值或 Ct 值>40，报告相应靶标为阴性。

1.3 若 FAM、ROX、Cy5、HEX/VIC 检测通道无 Ct 值或 Ct 值>40，则该样本检测结果无效，应重新提取该样本核酸后再次检测。

【检验方法的局限性】

1、本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检测及治疗反应等情况综合考虑。

2、样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，任何步骤的失误可能导致假阴性结果。

3、样本中模板浓度过低及样本中靶标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。

4、样本处理时若存在交叉污染，可能出现假阳性结果。

5、为保证检测的准确性，本试剂盒应按要求储存。

6、本试剂盒检测的样本类型仅为口咽拭子和鼻咽拭子。

7、检测的准确性取决于样本采集过程，样本采集不当、储存不当、不新鲜或反复冻融均会影响检测结果。

8、本试剂盒仅对样本中的百日咳杆菌 DNA 及耐药位点（A2047G）、副百日咳杆菌 DNA 提供定性检测。

【产品性能指标】

1. 准确性

采用本产品对企业参考品进行检测，检测结果均符合企业参考品要求。

2. 精密度

精密度研究结果表明，试剂盒批内/批间、日内/日间、不同操作者间、仪器间、实验室间均具有良好的检测精密度。检测阴性、临界阳性和中阳性样本，均符合可接受标准。

3. 干扰特异性

干扰试验研究表明：检测样本中可能存在的内源性干扰物和外源性干扰物，在所测试的浓度范围内纯化粘蛋白（8g/L）、人血液（5%）、脓液（5%）、苯福林（100 µg/mL）、羟甲唑啉（150 µg/mL）、氯化钠（含防腐剂）（60 µg/mL）、倍氯米松（200 µg/mL）、地塞米松（200 µg/mL）、曲安奈德（150 µg/mL）、布地奈德（256 µg/mL）、莫米松（200 µg/mL）、氟替卡松（20 µg/mL）、苯佐卡因（2.5 mg/mL）、薄荷脑（4 mg/mL）、扎那米韦（10 mg/mL）、利巴韦林（2.0 mg/mL）、奥司他韦（5 mg/mL）、帕拉米韦（2 mg/mL）、莫匹罗星（10 mg/mL）、妥布霉素（4 µg/mL）、红霉素（50 mg/mL）、罗红霉素（7.5 mg/mL）、阿奇霉素（100 mg/mL）、氟尼缩松（150 µg/mL）和盐酸组胺（100 µg/mL）等干扰物不干扰试剂盒检测结果。

交叉反应研究表明：本试剂盒可检测的病原体之间无交叉反应；与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体，如甲型 H1N1，甲型 H3N2，甲型 H5N1，甲型 H7N9，乙型流感病毒（Victoria），乙型流感病毒（Yamagata），博卡病毒，单纯疱疹病毒 1 型，肠道病毒，腺病毒 1 型，腺病毒 3 型，腺病毒 7 型，SARS 冠状病毒，诺如病毒，肺炎链球菌，奈瑟氏菌属，烟曲霉，卡他莫拉菌，副流感病毒 1 型，副流感病毒 2 型，副流感病毒 3 型，水痘带状疱疹病毒，麻疹病毒，冠状病毒 NL63，MERS 冠状病毒，肺炎衣原体，肺炎克雷伯菌，肺孢子

菌，金黄色葡萄球菌，白色念珠菌，新生隐球菌，乳酸杆菌属，巨细胞病毒，EB 病毒，流行性腮腺炎病毒，人偏肺病毒，轮状病毒，肺炎支原体，化脓性链球菌，流感嗜血杆菌，结核分枝杆菌，光滑念珠菌，唾液链球菌，棒状杆菌属，呼吸道合胞病毒 B 型，霍氏鲍特菌，支气管鲍特菌，表皮葡萄球菌，嗜肺军团菌，幽门螺旋杆菌，肺炎支原体 23S rRNA A2063G 突变，肺炎支原体 23S rRNA A2064G 突变，幽门螺旋杆菌 23S rRNA A2142G 突变，幽门螺旋杆菌 23S rRNA A2142C 突变，幽门螺旋杆菌 23S rRNA A2143G 突变等无交叉反应。

4. 包容性

对不同时间和不同地区的百日咳杆菌核酸及耐药突变位点、副百日咳杆菌核酸进行检测，均能正常检出。

5. 百日咳杆菌和副百日咳的最低检出限浓度均为 500 copies/mL；百日咳耐药突变位点的最低检出限浓度为 1000 copies/mL。

6. 临床试验结果：在 3 家临床单位完成临床试验。与一代测序方法相比，针对百日咳杆菌，阳性符合率 100%、阴性符合率 99.83%；针对百日咳杆菌耐药突变位点，阳性符合率 100%、阴性符合率 99.39%；针对副百日咳杆菌，阳性符合率 99.61%、阴性符合率 100%。与已批准上市的同类产品相比，针对百日咳检测，阳性符合率 100%、阴性符合率 100%。

【注意事项】

1. 在实验前，应详细阅读试剂盒使用说明书。

2. 本试剂盒仅用于体外诊断检测。

3. 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，操作过程中应避免接触到粘膜和皮肤。样本的处理应在可防止气溶胶外溢的生物安全柜中操作，样本的操作和处理均需符合国家卫健委《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》等相关法规要求。

4. 实验室应严格按照国家临床基因扩增实验室的管理规范进行设置和管理，实验人员进行专业培训和考核，实验室应具备试剂准备区（准备所需试剂）、样本制备区（处理待测样本及质控品）、PCR 扩增区（PCR 扩增检测）等隔离的分区，实验过程应分区进行，各区仪器设备不得共用，各区人员流动和空气流向应有严格要求，避免交叉污染。

5. 实验过程中应穿着工作服，佩戴一次性口罩和无粉乳胶手套，与反应液接触的物品应使用一次性实验耗材。

6. 本试剂盒各组分在使用前要完全解冻，摇匀后需离心数秒再使用，应尽量避免各试剂的反复冻融。

7. 实验中用过的离心管和吸头等耗材应弃于装有消毒剂的容器中；PCR 结束后，为避免产物引起污染，应将反应管用密封袋扎紧袋口后，作为医疗废弃物按流程统一处理。

8. 实验完毕后用 0.5%~1%次氯酸钠或 75%乙醇处理工作台面和移液器，再用紫外灯照射 30 分钟。

【参考文献】

- [1] 李丽君, 叶金艳, 姚开虎. 百日咳的实验室诊断方法研究进展[J]. 中华传染病杂志, 2017, 35(12), 765-768.
- [2] 王增国, 刘莹, 韩锐郡, 等. 百日咳鲍特菌红霉素耐药性及耐药相关分子特征分析 [J]. 中国疫苗和免疫, 2016(2):180-182,179.
- [3] 杨永弘, 杨颖. 百日咳杆菌耐药[J]. 中华实用儿科临床杂志, 2016, 031(4):P.263-265.
- [4] Kösters K, U, Schmetz J, Riffelmann M, Wirsing von König CH. Real-time LightCycler PCR for detection and discrimination of Bordetella pertussis and Bordetella parapertussis[J]. Journal of Clinical Microbiology, 2002.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：深圳市亿立方生物技术有限公司

住所：深圳市坪山新区坪山办事处六联社区浪尾村宝山路 16 号 B 栋 9 楼 01 区

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：深圳市坪山新区坪山办事处六联社区浪尾村宝山路 16 号 B 栋 9 楼 01 区；深圳市坪山区坪山街道办事处六联社区浪尾村宝山路 16 号 C 栋 6 楼 02 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】