

受理号：CSZ2000070

医疗器械产品注册技术审评报告

产品中文名称：肺炎克雷伯菌及耐碳青霉烯类抗生素基因

KPC 检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：宁波基内生物技术有限公司

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.....	5
三、 临床评价概述.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

宁波基内生物技术有限公司

二、申请人住所

浙江省宁波市镇海区庄市街道中官西路 777 号

三、生产地址

浙江省宁波市镇海区庄市街道中官西路 777 号

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品试剂盒由以下组分组成，主要组成成分见下表。

表 1 试剂盒主要组成成分

组分	主要成分
核酸 抽提液	含有 Chelex-100, Tris-HCl 的混合液
肺炎克雷伯菌外膜磷酸 蛋白 (phoE) 基因 PCR 检测 混合液	含有脱氧核糖核苷三磷酸 (dN(U)TP)、 10×Buffer、引物、荧光探针和 MgCl ₂ 的溶液
肺炎克雷伯菌碳青霉烯 酶 (KPC) 基因 PCR 检测混 合液	含有脱氧核糖核苷三磷酸 (dN(U)TP)、 10×Buffer、引物、荧光探针和 MgCl ₂ 的溶液
酶 (水生栖热菌 DNA 聚合 酶+尿嘧啶-N-糖基化酶)	含有水生栖热菌 DNA 聚合酶 (Taq 酶) 和尿嘧 啶-N-糖基化酶 (UNG 酶) 的溶液
内标	含有内标基因片段的质粒
阴性对照品	含有灭活的大肠杆菌菌液
阳性对照品	含有目的基因片段的灭活的基因工程菌溶液

其他内容详见产品说明书。

(二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测人痰液样本中肺炎克雷伯菌外膜磷酸蛋白 phoE 基因和 KPC 基因。

肺炎克雷伯菌为革兰阴性杆菌，存在于人体上呼吸道和肠道，当机体抵抗力降低时易经呼吸道进入肺部。在肺泡内生长

繁殖时，可引起组织坏死、液化、形成单个或多发性脓肿。病变累及胸膜、心包时，可引起渗出性或脓性积液。肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶（KPC）是近来新发现的一类碳青霉烯酶，能够水解包括碳青霉烯类抗生素等多种 β -内酰胺类抗菌药物。KPC 基因位于可转移性质粒上，可在菌株间传播，形成耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌（CRKP）。CRKP 是酒精中毒者、糖尿病和慢性阻塞性肺部疾病患者并发肺部感染的潜在危险因素，可引起肺炎、尿路感染、脑膜炎、全身败血症等。

（三）产品包装规格

20 人份/盒

（四）产品检验原理

本试剂盒采用 Taqman 荧光定量 PCR 法。分别针对 phoE、KPC、内标核酸保守区设计引物和荧光标记探针。phoE、KPC 基因探针 5'端标记荧光报告基团 FAM，3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA；内标基因探针 5'端标记荧光报告基团 JOE，3'端标记荧光淬灭基团 BHQ1。引物、探针配成 PCR 检测混合液后，加入酶、样本核酸和内标，选用荧光 PCR 仪上的 FAM、JOE 通道进行扩增，通过荧光信号的变化实现目的基因的检测。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1.主要原材料的选择

本产品制备过程中主要原材料包括：引物、探针、Taq酶、dN(UTPs、UNG酶、内标、对照品等。主要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申请人，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的设置情况

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品、准确度参考品以及精密度参考品。

阳性参考品P1、P2为phoE阳性且KPC阴性临床样本；P3、P4为phoE阴性且KPC阳性临床样本；P5、P6为phoE阳性且KPC阳性临床样本。

阴性参考品N1~N9为试剂盒未覆盖的9种临床阴性样本，N1~N3为正常人痰液样本，其余为大肠埃希菌和金黄色葡萄球菌感染的样本DNA。

准确度参考品S1~S2为含有phoE、KPC基因的质粒。

最低检出限参考品L1~L2为含有phoE、KPC基因的质粒。

精密度参考品S3~S6为两个浓度水平含有phoE、KPC基因的质粒。

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灭活目标基因片段的基因工程菌溶液，阴性对照品为灭活的大肠杆菌溶液。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业内部参考品试验，确定最佳的生产工艺及反应体系，包括：对引物、探针、Taq酶、UDG酶、dNTPs、Mg²⁺离子等的浓度和体积进行了优化；对PCR反应液、对照品的配液工序、分装工序、包装工序等进行了优化；同时对临床样本上样量、PCR反应程序、样本采集处理、样本液化条件等的研究，并通过验证，最终确定了最佳反应体系和条件。

(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、准确度、精密度、最低检测限、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连续三批产品，在适用机型上的性能评估资料。

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的提取效果，结果表明配套使用的核酸提取试剂的核酸提取效率满足本产品使用需求。

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、企业阴性参考品以及临床样本。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，对两个不同浓度的参考品和阴性样本，进行了连续 20 天的重复性检测，评估了如批内/间、日内/间、操作者间、仪器间、实验室间的精密度进行评价。结果表明：批内/间、日内/间、不同操作者间、不同适用机型、实验室间均有着很好的检测重复性，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，检测不同浓度梯度的参考品和临床阳性样本，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，并进行最低检测限验证。最终确定该产品最低检测限为按照质粒拷贝数确定的最低检测限为 10^3 copies/mL，按照菌培养法确定的最低检测限为 10^3 CFU/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 *phoE* 检测。包括肺炎克雷伯菌亚种：肺炎克雷伯菌肺炎亚种、肺炎克雷伯菌鼻硬结亚种、肺炎克雷伯菌臭鼻亚种。检测结果表明，本试剂对不同地区的肺炎克雷伯菌各亚种均能正确检出，说明试剂盒包容性良好。申请人采用三批成品试剂盒，对收集的碳青霉烯酶型别进行 KPC 检测，对 KPC 基因各亚型均能正确检出，说明试剂盒包容性较好。

在交叉反应研究中，申请人采用三批成品试剂盒，进行了近源菌及不在试剂盒检测范围中的呼吸道感染相关病原体及其他碳青霉烯酶型别的基因等的交叉反应。结果表明：本试剂盒与粪肠球菌、屎肠球菌、白喉杆菌、流感嗜血杆菌、变形杆菌、奇异变形杆菌、鲍曼不动杆菌、脑膜炎奈瑟菌、血链球菌、甲氧西林敏感表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌甲氧西林敏感株、大肠埃希菌、产酸克雷伯菌、洋葱伯克霍尔德菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、嗜麦芽寡养单胞杆菌、肺炎链球菌、卡他莫拉菌、化脓链球菌、阴沟肠杆菌、粘质沙雷菌、产气肠杆菌不会产生交叉反应；对 SME、NDM、VIM、IMP 及 OXA-48 碳青霉烯水解酶型别的基因不会产生交叉反应。

在干扰性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，进行了内源性干扰物的研究，对临床样本中可能存在的干扰物分别进行评价。包括常见的内源性干扰物黏蛋白（ $\leq 0.9\text{mg/mL}$ ），胆酸盐（ $\leq 0.9\%$ ）、消化酶（ $\leq 1.25\%$ ）；外源性干扰物阿莫西林（ 42.6mg/L ）、头孢西丁（ $110\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ）、亚胺培南（ $66\mu\text{g/mL}$ ）、罗红霉素（ $7.9\mu\text{g/mL}$ ）、诺氟沙星（ $5\mu\text{g/mL}$ ）、阿米卡星（ $64\mu\text{g/mL}$ ）、盐酸万古霉素（ $\leq 30\text{mg/mL}$ ）、氨曲南（ $\leq 49\text{mg/mL}$ ）、美罗培南（ $\leq 112\text{mg/mL}$ ）、多粘菌素 B（ $\leq 100\mu\text{g/mL}$ ）、头孢拉定（ $\leq 40.9\text{mg/mL}$ ）、头孢曲松钠（ $\leq 150.9\text{mg/L}$ ）、头孢吡肟盐酸

盐 ($\leq 133\text{mg/L}$)、氨苄青霉素 ($\leq 12\text{mg/L}$)、盐酸左氧氟沙星 ($\leq 6.3\text{mg/L}$)、他唑巴坦 ($\leq 21.6\text{mg/L}$)、利福平 ($\leq 11\text{mg/L}$)、舒巴坦 ($\leq 138.7\text{mg/L}$) 等。结果表明：相应的内源性 & 外源性干扰物质不会对产品的检测结果产生干扰。

(四) 阳性判断值研究

申请人对收集的临床样本进行检测，获得原始的 Ct 值，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为 CT=35。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开瓶稳定性、反复冻融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 & 临床样本的有效保存时间。

实时稳定性：试剂盒储存于 -18°C 及以下保存。分别于不同时间点领取完整包装的试剂盒，对其外观、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、准确度、最低检测限和精密度进行考察。结果表明试剂盒在 -18°C 及以下保存本试剂盒有效期为 12 个月。

开瓶稳定性及反复冻融稳定性：申请人对成品试剂盒按照规定储存温度进行储存，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外观、

阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、准确度、最低检测限、精密度进行考察。结果表明，试剂开瓶后 2 个月，使用过程中尽量避免反复冻融，冻融次数不宜超过 5 次。

申请人对样本保存稳定性进行了研究。结果表明：适用于本试剂的样本可在 2℃~8℃放置 7 天，≤-18℃放置 6 个月，避免反复冻融。

三、临床评价概述

申请人在复旦大学附属华山医院、上海市东方医院、上海市儿童医院共 3 家机构完成了临床试验。临床试验主要包括两部分：

第一，采用试验体外诊断试剂与已上市同类产品进行比较研究，确认本产品的临床性能。样本类型为痰液。对比试剂选择上海之江生物科技股份有限公司的肺炎克雷伯菌核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）和碳青霉烯耐药基因 KPC 检测试剂盒（荧光 PCR 法）。临床试验共纳入病例 515 例。

针对肺炎克雷伯菌基因检测，纳入阳性病例 184 例，阴性病例 331 例；试验结果显示，申报产品与对比试剂检测的阳性符合率 97.28%（95%CI: 93.80%，98.83%），阴性符合率 99.09%（95%CI: 97.37%，99.69%）。针对 KPC 耐药基因检测，纳入阳性病例 99 例，阴性病例 416 例；试验结果显示，申报产品与

对比试剂检测的阳性符合率 97.98%(95%CI: 92.93%, 99.44%), 阴性符合率 98.56% (95%CI: 96.89%, 99.34%)。试验体外诊断试剂与对比试剂具有较好的一致性。

第二, 采用试验体外诊断试剂与细菌培养鉴定和药敏试验进行比较研究, 试验结果显示, 申报产品与细菌培养鉴定对比的灵敏度为 97.09%(95%CI: 93.38%, 98.75%), 特异度为 95.63% (95%CI: 92.91%, 97.33%); 两者一致性较好。申报产品与药敏试验对比的灵敏度为 51.20% (95%CI: 43.66%, 58.70%), 特异度为 91.53% (95%CI: 86.69%, 94.72%)。针对不一致样本进行了试验验证和原因分析。其中假阴性(药敏试验为耐药, 试验体外诊断试剂检测阴性)样本, 采用已上市产品针对用于药敏试验的分离菌株进行 KPC 型碳青霉烯酶检测和 KPC 基因检测, 结果均为阴性, 与试验体外诊断试剂痰液样本检测结果一致, 分析假阴性结果产生的原因可能为: 耐碳青霉烯类抗生素的耐药机制包括 KPC 基因等多种机制, 临床试验中假阴性结果可能由于其他耐药机制引起碳青霉烯类抗生素耐药。假阳性结果(药敏试验为敏感, 试验体外诊断试剂检测阳性)的验证试验和原因分析显示, 假阳性结果产生的原因可能包括: KPC 基因表达水平较低时, 尚未导致碳青霉烯类抗生素耐药表型改变, 以及含 KPC 基因的耐药菌株在临床样本中尚未成为优势菌,

药敏试验所挑选的分离培养菌株不是耐药菌等。此外，基于不同菌种（属）均可能产生 KPC 基因，但导致碳青霉烯类抗生素耐药的机制中，KPC 耐药占比不同的实际情况，申请人针对仅有肺炎克雷伯菌感染的患者和非肺炎克雷伯菌感染患者的药敏试验对比研究进行了亚组分析，对于仅有肺炎克雷伯菌感染的亚组，与药敏试验比较结果显示灵敏度为 86.67%（95%CI: 73.82%，93.74%）；对于非肺炎克雷伯菌感染亚组的药敏试验比较结果显示灵敏度为 20.25%（95%CI: 12.87%，30.40%）；试验结果与临床文献报道基本相符。

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。

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。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.本试剂盒体外定性检测人痰液样本中肺炎克雷伯菌外膜磷酸蛋白 *phoE* 基因和 KPC 基因。检测结果仅供临床参考，不得作为肺炎克雷伯菌或产 KPC 型碳青霉烯酶菌株感染或治疗的

监测确认，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反应等情况综合考虑。

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，属于境内同品种首个产品。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。

2023 年 7 月 10 日

附件：产品说明书

肺炎克雷伯菌及耐碳青霉烯类抗生素基因 KPC 检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：肺炎克雷伯菌及耐碳青霉烯类抗生素基因 KPC 检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

20 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人痰液样本中肺炎克雷伯菌外膜磷酸蛋白 *phoE* 基因和 KPC 基因。

肺炎克雷伯菌为革兰阴性杆菌，存在于人体上呼吸道和肠道，当机体抵抗力降低时易经呼吸道进入肺部。在肺泡内生长繁殖时，可引起组织坏死、液化、形成单个或多发性脓肿。病变累及胸膜、心包时，可引起渗出性或脓性积液。肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶（KPC）是近来新发现的一类碳青霉烯酶，能够水解包括碳青霉烯类抗生素等多种 β -内酰胺类抗菌药物。KPC 基因位于可转移性质粒上，可在菌株间传播，形成耐碳青霉烯类肺炎克雷伯菌（CRKP）。CRKP 是酒精中毒者、糖尿病和慢性阻塞性肺部疾病患者并发肺部感染的潜在危险因素，可引起肺炎、尿路感染、脑膜炎、全身败血症等。

【检测原理】

本试剂盒采用 Taqman 荧光定量 PCR 法。分别针对 *phoE*、KPC、内标核酸保守区设计引物和荧光标记探针。*phoE*、KPC 基因探针 5'端标记荧光报告基团 FAM，3'端标记荧光淬灭基团 TAMRA；内标基因探针 5'端标记荧光报告基团 JOE，3'端标记荧光淬灭基团 BHQ1。引物、探针配成 PCR 检测混合液后，加入酶、样本核酸和内标，选用荧光 PCR 仪上的 FAM、JOE 通道进行扩增，通过荧光信号的变化实现目的基因的检测。

【主要组成成分】

序号	组分	数量	体积/人份	主要成分
1	核酸抽提液	1.2mL×1	50 μ L	含有 Chelex-100,Tris-HCl 的混合液
2	肺炎克雷伯菌外膜磷酸蛋白(<i>phoE</i>)基因 PCR 检测混合液	352 μ L×1	16 μ L	含有脱氧核糖核苷三磷酸 (dN(UTP)、10×Buffer、2 对引物、2 条荧光探针和 $MgCl_2$ 的溶液
3	肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)基因 PCR 检测混合液	352 μ L×1	16 μ L	含有脱氧核糖核苷三磷酸 (dN(UTP)、10×Buffer、2 对引物、2 条荧光探针和 $MgCl_2$ 的溶液
4	酶（水生栖热菌 DNA 聚合酶+尿嘧啶-N-糖基化酶）	13.6 μ L×1	0.4 μ L	含有水生栖热菌 DNA 聚合酶(Taq 酶)和尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG 酶)的溶液
5	内标	100 μ L×1	—	含有内标基因片段的质粒，拷贝数 10^4 copies/mL
6	阴性对照品	100 μ L×1	—	含有灭活的大肠杆菌菌液，菌浓度 10^5 CFU/mL
7	阳性对照品	100 μ L×1	—	含有目的基因片段的灭活的基因工程菌溶液，菌浓度 10^5 CFU/mL

说明：不同批次产品间的组分不得互换使用。

需要单位但未提供（其他需要自备的试剂及耗材）：

1. 氢氧化钠（片状）：生产商：国药集团化学试剂有限公司，CAS 号：1310-73-2，纯度要求：分析纯 AR；
2. 氯化钠：生产商：国药集团化学试剂有限公司，CAS 号：7647-14-5，纯度要求：分析纯 AR；
3. 1.5mL 离心管；
4. 各种规格的移液器，包括移液器适配的枪头；
5. 0.2mL 荧光定量 PCR 专用八连管和透明管盖；
6. 离心机、恒温加热器。

【储存条件和有效期】

-18℃及以下保存，有效期 12 个月。

开瓶稳定性：2 个月。

反复冻融次数：不宜超过 5 次。

生产日期，使用期限或失效日期：见标签。

【适用仪器】本试剂盒适用于实时荧光定量 PCR 仪（型号：7500；注册人名称：Life Technologies Holdings Pte Ltd），全自动医用 PCR 分析系统（型号：Gentier 96E；注册人名称：西安天隆科技有限公司）。

【样本要求】

痰液：采集痰液样本前，应让受检者漱口以除去大部分口腔内杂菌，指导受检者用力咳出气管深部的痰液于无菌痰杯中，痰液量不少于 1mL，以晨痰为佳，必要时可使用吸痰设备辅助采集。标本采集后应立即密闭送检。

上述样本可在 2℃~8℃放置 7 天，≤-18℃放置 6 个月，避免反复冻融。

【检验方法】

1. 样本、对照品核酸提取

取内标加入到核酸抽提液中，加入比例为 1：50，后面实验步骤均使用加入内标的核酸抽提液。

(1) 痰液：向痰杯中加入 2mL4% NaOH 消化试剂，混匀，静置 10min 后量取消化后样本的体积，计算原始痰液体积，补充 4% NaOH 消化试剂至 2 倍痰液体积，混匀，室温下继续液化 20min。取 1mL 混合液，12,000rpm 5min。沉淀加无菌生理盐水 1mL 打匀，12,000rpm 5min；去尽上清，沉淀中直接加入 50 μ L 含内标的核酸抽提液，充分混匀，98℃ 10min（误差不得超过 1min）。12,000rpm 5min，取上清 4 μ L 做 PCR 反应。

(2) 对照品：取阳性对照品、阴性对照品各 50 μ L 分别置于 1.5 mL（或 0.5 mL）离心管中（冻存试剂融化后振荡混匀 10sec），分别加入含内标的核酸抽提液 50 μ L，充分混匀，98℃ 10 min，然后 12,000 rpm 5 min，取上清 4 μ L 做 PCR 反应。

2. 试剂配制

取 $n \times 16 \mu$ L 肺炎克雷伯菌外膜磷酸蛋白(*phoE*)基因 PCR 检测混合液与 $n \times 0.2 \mu$ L 酶（水生栖热菌 DNA 聚合酶+尿嘧啶-N-糖基化酶）混合，振荡混匀数秒，3000 rpm 离心混匀数秒；取 $n \times 16 \mu$ L 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶(KPC)基因 PCR 检测混合液与 $n \times 0.2 \mu$ L 酶（水生栖热菌 DNA 聚合酶+尿嘧啶-N-糖基化酶）混合，振荡混匀数秒，3000 rpm 离心混匀数秒。

3. 加样

分别取上述混合液 16 μ L 置于 PCR 管中，然后将样本、阴性对照品、阳性对照品的处理上清液各 4 μ L 分别加入各个已有混合液的 PCR 管中，盖好管盖，立即进行荧光 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增

反应管置于荧光定量 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

37℃×2min，94℃×2min，循环 1 次；93℃×15sec，60℃×60sec，循环 40 次；单点荧光检测在 60℃，反应体系为 20 μ L。

荧光通道检测选择：*phoE*、KPC 基因选用 FAM 通道，内标基因选用 JOE 通道。

5. 基线和阈值设定

基线一般情况下设定在 6-15 个循环，具体可根据实际情况调整。基线调整原则：选择指数扩增前荧光信号较稳定的区域，起点（Start）避开荧

光采集起始阶段的信号波动，终点（End）比最早出现指数扩增的样本 C_T 值减少 1-2 个循环。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。

注意：实验结束后，待热盖冷却，使用 2 层 PE 手套包扎好 PCR 反应条，并按生物垃圾处理，严禁打开 PCR 管盖，以防造成污染。

6. 质量控制

对照品的正常结果为：

（1）阴性对照品：FAM 通道 Cycle threshold 栏均显示“Undetermined”，JOE 通道 C_T 值显示“ ≤ 35 ”；

（2）阳性对照品：FAM、JOE 通道 C_T 值均显示“ ≤ 35 ”；

若对照品检测结果与上述正常结果的任意一项不同，则试验视为无效，需重复试验。

注：各种适用仪器的检验方法一致。

【阳性判断值或者参考区间】

本试剂盒的阳性判断值为 $C_t=35$ 。

临床单位使用阳性判断值时，各实验室应建立自己的临床正常及病理值范围。

【检验结果的解释】

在对照品检测结果正常的情况下，两种适用仪器的检测结果如下：

阳性结果判定：

待检样品在 FAM 通道 C_T 值显示 Undet，同时 JOE 通道 C_T 值 ≤ 35 ，表示检测样品低于试剂盒检测限，报告为阴性（-）；

待检样品在 FAM 通道及 JOE 通道 C_T 值均 ≤ 35 ，检测结果报告为阳性（+）。

Multicomponent Plot



A 为典型的阳性扩增曲线；B 为阴性检测结果

◆备注：

（1）对于 FAM 通道的 C_T 值在 35~40 之间，JOE 通道 C_T 值 ≤ 35 的样本，则需对核酸提取产物进行重复检测；若重复检测 C_T 值结果仍在 35~40 之间，且扩增曲线呈 S 型，则判断为阳性；若扩增结果为直线，则判断为阴性。

（2）对于 FAM 通道具有明显 S 型扩增曲线（ $C_t \leq 35$ ）的样本，其 JOE 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线（ $C_t \leq 35$ ），也可能因为高浓度的目的基因竞争性抑制而导致无 S 型扩增曲线或 Undetermined。

（3）当样本在 FAM 及 JOE 通道均显示为 Undetermined，则表示 PCR 反应受到抑制或提取不当，需重复试验。

【检验方法的局限性】

1. 当待测样本中被检测核酸浓度含量低于最低检测限度 10^3 copies/mL 时会显示假阴性结果。
2. 本试剂盒仅对肺炎克雷伯菌 *phoE* 基因和 KPC 耐药基因进行检测，无法区别各基因的分型。
3. 本方法仅对痰液样本进行检测，结果无法区分定植菌、污染菌或致病菌。
4. 实验室环境污染，试剂污染，样品交叉污染会出现假阳性结果；试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，会出现假阴性。
5. 当待测样本中被检核酸浓度含量低于试剂盒最低检测时可能会发生假阴性的结果；不合理的样本采集、转运及处理有可能会发生假阴性结果。
6. 若试剂盒的检测结果显示肺炎克雷伯菌 *phoE* 基因阳性、KPC 基因阳性，无法判断 KPC 基因是否为存在于肺炎克雷伯菌上，需进一步确认。
7. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不得作为肺炎克雷伯菌或产 KPC 型碳青霉烯酶菌株感染或治疗的监测确认，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反应等情况综合考虑。
8. 本试剂盒对 KPC 检测结果为阴性时，仅代表该样本中 KPC 基因低于本试剂盒的检测限但不能完全排除其他耐药机制导致的感染可能。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒最低检测限：按照质粒拷贝数确定的最低检测限为 10^3 copies/mL，按照菌培养法确定的最低检测限为 10^3 CFU/mL。
2. 本试剂中 *phoE* 基因检测结果与粪肠球菌、屎肠球菌、白喉杆菌、流感嗜血杆菌、变形杆菌、奇异变形杆菌、鲍曼不动杆菌、脑膜炎奈瑟菌、血链球菌、甲氧西林敏感表皮葡萄球菌、金黄色葡萄球菌甲氧西林敏感株、大肠埃希菌、产酸克雷伯菌、洋葱伯克霍尔德菌、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、嗜麦芽寡养单胞杆菌、肺炎链球菌、卡他莫拉菌、化脓链球菌、阴沟肠杆菌、粘质沙雷菌、产气肠杆菌均无交叉反应。本试剂中 KPC 基因检测结果与碳氢酶水解酶基因 NDM、SME、VIM、IMP、OXA-48 均无交叉反应。
3. 精密性：用弱阳性、中等阳性的精密度参考品进行检测（ $n=10$ ），检测结果 C_T 值的变异系数（CV，%）均 $\leq 5.0\%$ 。
4. 抗干扰能力：黏蛋白、胆酸盐、消化酶、阿莫西林、头孢西丁、亚胺培南、罗红霉素、诺氟沙星、阿米卡星、盐酸万古霉素、氨曲南、美罗培南、多粘菌素 B、头孢拉定、头孢曲松钠、头孢吡肟盐酸盐、氨苄青霉素、盐酸左氧氟沙星、他唑巴坦、利福平、舒巴坦不会对本产品的检测产生干扰。
5. 阳性参考品符合率：企业阳性参考品检测结果不得出现假阴性，符合率 6/6。
6. 阴性参考品符合率：企业阴性参考品检测结果不得出现假阳性，符合率 9/9。
7. 临床性能：采用试验体外诊断试剂与已上市同类产品进行比较研究，共纳入病例 515 例。针对肺炎克雷伯菌基因检测，申报产品与对比试剂检测的阳性符合率 97.28%（95%CI：93.80%，98.83%），阴性符合率 99.09%（95%CI：97.37%，99.69%）。针对 KPC 耐药基因检测，申报产品与对比试剂检测的阳性符合率 97.98%（95%CI：92.93%，99.44%），阴性符合率 98.56%（95%CI：96.89%，99.34%）。采用试验体外诊断试剂与细菌培养鉴定和药敏试验进行比较研究，试验结果显示，申报产品与细菌培养鉴定对比的灵敏度为 97.09%（95%CI：93.38%，98.75%），特异度为 95.63%（95%CI：92.91%，97.33%）；申报产品与药敏试验对比的灵敏度为 51.20%（95%CI：43.66%，58.70%），特异度为 91.53%（95%CI：86.69%，94.72%）。

【注意事项】

1. 整个检测过程严格分三区进行：试剂准备区、样本处理及加样区、荧光 PCR 扩增区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即清理工作台，并进行消毒。
2. 使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤芯吸头。
3. 试剂准备和标本处理应用超净工作台（负压式）或防污染罩，以防止对环境污染。
4. 每次实验应设置阴、阳对照品。
5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。

- 6.操作台。移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应常用 10%次氯酸或 75%酒精、紫外灯或臭氧消毒处理。
- 7.实验中接触过标本的废弃物（如吸头）、扩增完毕的离心管、标本等应进行无害化处理后方可丢弃。
- 8.试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
- 9.PCR 反应混合液应避免光保存。
- 10.反应管中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧。
- 11.不同批号的试剂请勿混合，请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

- 1.Qiwen Yang,Hui Wang,Hongbin Chen,et al.Phenotypic and Genotypic Characterization of *Enterobacteriaceae* with Decreased Susceptibility to Carbapenems:Results from Large Hospital-Based Surveillance Studies in China[J].American Society for Microbiology.2010,54(1):573-577.
- 2.Justin M.Cole,Audrey N.Schuetz,Charles E.Hill,et al.Development and Evaluation of a Real-Time PCR Assay for Detection of *Klebsiella pneumoniae* Carbapenemase Genes[J].CLINICAL MICROBIOLOGY.2009,47(2):322-326.
- 3.Musa Hindiyeh,Gill Smollen,Zehava Grossman,et al.Rapid Detection of *bla*_{KPC} Carbapenemase Gene by Real-Time PCR[J].CLINICAL MICROBIOLOGY.2008,46(9):2879-2883.
- 4.Amos Adler,Efrat Khabra,Inna Chmelnitsky,et al.Development and validation of a multiplex PCR assay for identification of the epidemic ST-258/512 KPC-producing *Klebsiella pneumoniae* clone[J].Diagnostic Microbiology and infectious Disease.2014,78:12-15.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宁波基内生物技术有限公司
住所：浙江省宁波市镇海区庄市街道中官西路 777 号
联系方式：
售后服务单位名称：
联系方式：
生产地址：浙江省宁波市镇海区庄市街道中官西路 777 号
生产许可证编号或生产备案凭证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE