

• 专论 •

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

刘容枝

【摘要】 结核分枝杆菌复合群脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)检测试剂的分析性能评估资料是该类试剂注册申报资料的一项重要的技术资料。作者总结分析性能评估资料需要包括的主要项目与相关的技术细节,指导生产企业科学合理地进行试剂研发。

【关键词】 结核分枝杆菌; DNA; 细菌; 试剂盒; 诊断

The analytic performance studies of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA detection reagents LIU Rong-zhi.

Center for Medical Device Evaluation, CFDA, Beijing 100044, China

Corresponding author: LIU Rong-zhi, Email: liurz@cmde.org.cn

【Abstract】 The material of the analytic performance studies of *Mycobacterium tuberculosis* Complex DNA detection reagents is an important technical document of the application materials for reagent registration. The main aim of this paper is to summarize the main projects and related technical details of analytic performance evaluation studies in order to guide manufactures to conduct research and development of reagents scientifically and rationally.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; DNA; bacterial; Reagent kits; diagnostic

结核分枝杆菌复合群包括结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、牛结核分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、非洲分枝杆菌(*Mycobacterium africanum*)、卡内蒂分枝杆菌(*Mycobacterium canettii*)、羊分枝杆菌(*Mycobacterium caprae*)和田鼠分枝杆菌(*Mycobacterium microti*)。在结核分枝杆菌复合群中,除田鼠分枝杆菌对人无致病力外,其他几种菌均可致病,产生相同的临床表现和大体相同的对药物的敏感度谱型。因此,临床上往往只作结核分枝杆菌复合群的鉴定而无须进行种水平的鉴定^[1]。

结核分枝杆菌复合群脱氧核糖核酸(deoxyribonucleic acid, DNA)检测试剂是指利用 PCR 核酸检测技术,以特定的结核分枝杆菌复合群共有的基因序列为检测目标,对人痰液等呼吸道样本中的结核分枝杆菌复合群进行体外定性检测的试剂,用于结核患者的辅助诊断。

分析性能评估资料是体外诊断试剂注册申报资料非常重要的一项技术资料^[2]。参考美国食品药品监督管理局的相关文件^[3],结合审评中对国内外企业有关该部分资料的理解与总结^[4-7],现对结核分枝杆菌复合群 DNA 检测试剂的分析性能研究提出如下建议。

最低检测限

一、最低检测限的确定

建议使用结核分枝杆菌、BCG(如适用)的梯度稀释液来

确定最低检测限。每个梯度的稀释液重复 3~5 份,每份进行不少于 20 次的重复检测,将具有 95%阳性检出率的菌株浓度作为最低检测限。应明确每份菌株的来源、基因型和表型特性,如来源于美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC)等,菌株的基因组中含有多少拷贝的靶基因等信息。建议采用铺板并计数细菌集落形成单位(colony-forming units, CFU)的方法进行菌株浓度的确认。应采用实际铺板并对细菌集落进行计数的方式来确定细菌集落形成单位,而不是通过推理计算来估计菌株浓度(如麦氏单位)。

实际操作中,建议将已知浓度的菌株与结核分枝杆菌复合群阴性的痰样本进行混合后,完全按照试剂盒的操作方法对此“制备痰样本”进行样本前处理(如液化)、核酸提取扩增等。对结核分枝杆菌复合群阴性痰样本的确认,应采用培养鉴定、临床诊断、已上市试剂盒和检测试剂进行联合确认。

具体操作如下。(1)液化:在痰液中加入 1~2 倍体积的 4%氢氧化钠(NaOH)溶液,混匀,室温下放置 20 min,使其充分液化。(2)洗涤:取 1 ml 液化后痰液至 1.5 ml 离心管,10 000×g 离心 10 min,尽可能完全倾倒入清;沉淀用 1 ml 生理盐水悬浮,同上离心条件洗涤 2 次。(3)提取:向含沉淀物的离心管中加入 5 μl DNA 提取液,混匀,沸水浴 10 min,然后冷却至室温;10 000×g 离心>5 min,吸取上清液作为模板备用。

具体而言,向“菌株与阴性痰液的混合物”中加入 1~2 倍混合物体积的 4%氢氧化钠溶液,液化、洗涤后提取 DNA。

二、最低检测限的验证

建议在最低检测限的菌株浓度对结核分枝杆菌、BCG

doi:10.3969/j.issn.1000-6621.2015.03.018

作者单位:100044 北京,国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心

通信作者:刘容枝,Email: liurz@cmde.org.cn

(如适用)进行至少 20 次的重复试验验证,每种菌株的阳性检出率应至少为 95%。企业应能够提供用于最低检测限验证的各个菌株的来源、表型及浓度等信息。建议在最低检测限的核酸浓度对上述菌株的核酸进行至少 20 次的重复试验验证,每种菌株的核酸的阳性检出率应至少为 95%。企业应能够提供用于最低检测限验证的各种临床菌株的核酸的来源及浓度等信息。

分析特异性

一、交叉反应

用于结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂交叉反应验证的病原体种类主要考虑以下几方面:核酸序列具有同源性、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。包括:非结核分枝杆菌(nontuberculous mycobacteria, NTM)、常见的口腔和呼吸道共生的病原菌等,具体目录如下。

1. 用于交叉反应性研究的其他分枝杆菌(非结核分枝杆菌):亚洲分枝杆菌(*Mycobacterium asiaticum*)、嗜血分枝杆菌(*Mycobacterium haemophilum*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)、玛尔摩分枝杆菌(*Mycobacterium malmoeenes*)、海分枝杆菌(*Mycobacterium marinum*)、龟分枝杆菌(*Mycobacterium chelonae*)、猿猴分枝杆菌(*Mycobacterium simiae*)、偶然分枝杆菌(*Mycobacterium fortuitum*)、微黄分枝杆菌(*Mycobacterium flavescens*)、土地分枝杆菌(*Mycobacterium terrae*)、戈登分枝杆菌(*Mycobacterium gordonae*)、施氏分枝杆菌(*Mycobacterium shimodii*)、蟾蜍分枝杆菌(*Mycobacterium xenopi*)、耐热分枝杆菌(*Mycobacterium thermoresistibile*)、鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、草分枝杆菌(*Mycobacterium phlei*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、溃疡分枝杆菌(*Mycobacterium ulcerans*)、胃分枝杆菌(*Mycobacterium gastris*)、脓肿分枝杆菌(*Mycobacterium abscessus*)、瘰癧分枝杆菌(*Mycobacterium scrofulaceum*)、耻垢分枝杆菌(*Mycobacterium smegmatis*)、隐藏分枝杆菌(*Mycobacterium celatum*)、日内瓦分枝杆菌(*Mycobacterium genavense*)、产黏液分枝杆菌(*Mycobacterium mucogenicum*)、次要分枝杆菌(*Mycobacterium triviale*)、苏加分枝杆菌(*Mycobacterium szulgai*)。

2. 用于交叉反应研究的其他病原体:肺炎链球菌(*Streptococcus pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)、黏膜炎莫拉菌(*Mucositis mora bacteria*)、绿脓杆菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、大肠埃希菌(*Escherichia Coli*)、嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、肺炎支原体(*Mycoplasma pneumonia*)、表皮葡萄球菌(*Staphylococcus epidermidis*)、副百日咳博德特菌(*Bordetella parapertussis*)、巴西诺卡菌(*Nocardia brasiliensis*)、北京棒杆菌(*Corynebacterium beijingense*)、甲型溶血性链球菌(*Alpha hemolytic streptococcus*)、乙型溶血性链球菌(*Beta hemolytic streptococcus*)、沙门菌(*Salmonella*)、副流感嗜血杆菌(*Haemophilus parainfluenzae*)、白色念珠菌(*Candida albi-*

cans)、百日咳博德菌(*Bordetella pertussis*)和肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)。

3. 建议在病原体感染的医学相关水平进行交叉反应的验证:应提供用于交叉反应验证的病原体的来源、种属和浓度确认等试验资料。其中,浓度应是实际计数获得的浓度,而非理论计算得到的浓度(如麦氏单位或者吸光度值)。实际操作中,建议将已知浓度的菌株与结核分枝杆菌复合群阴性的痰样本进行混合,并完全按照试剂盒的操作方法对此“痰样本”进行样本前处理、核酸提取扩增等。对结核分枝杆菌复合群阴性痰样本的确认,应采用培养鉴定、临床诊断、已上市试剂盒和检测试剂进行联合确认。

为了确认高浓度的非结核分枝杆菌复合群是否对低浓度的结核分枝杆菌复合群产生干扰,建议将已知浓度的非结核分枝杆菌复合群、结核分枝杆菌以及结核分枝杆菌复合群阴性的痰样本进行混合,并完全按照试剂盒的操作方法对此“痰样本”进行样本前处理、核酸提取扩增等。建议采用如下非结核分枝杆菌复合群检测该项目:鸟分枝杆菌(*Mycobacterium avium*)、胞内分枝杆菌(*Mycobacterium intracellulare*)、堪萨斯分枝杆菌(*Mycobacterium kansasii*)和玛尔摩分枝杆菌(*Mycobacterium malmoeenes*)。

二、干扰物质

潜在的干扰物质主要包括:内源性物质(如:血液、黏液或人细胞);外源性物质(鼻用药物、咽喉用药物,以及口服药物)和结核病治疗中常使用的药物。建议使用医学相关水平的干扰物浓度进行验证。另外,建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度(最差条件)条件下进行评价。对于常见药物干扰试验,建议参照相应药物药代动力学研究确定的治疗药物浓度添加相应药物进行干扰验证。建议在结核分枝杆菌或牛结核分枝杆菌的最低检测限浓度水平对每种干扰物质的影响进行研究。

建议用于干扰研究的物质目录如下:异烟肼、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、利福平、卡那霉素、链霉素、卷曲霉素、丁胺卡那霉素、人细胞、过敏性症状缓解药物、血液、口服麻醉剂和镇痛剂、抗生素、抗毒药、鼻腔喷雾剂或滴鼻剂和鼻腔糖皮质激素。

精 密 度

测量精密度的评价方法并无统一的标准可依,可根据不同产品特征或企业的研究习惯进行,前提是必须保证研究的科学性。具体实验方法可以参考国内有关体外诊断产品性能评估的文件进行。企业应对每项精密度指标的评价标准做出合理要求,如标准差或变异系数的范围等。针对本类产品的精密度评价,主要包括以下要求:(1)对可能影响检测精密度的主要变量进行验证,除检测试剂(包括提取组分和 PCR 组分)本身的影响外,还应应对 PCR 分析仪、操作者、地点等要素进行相关的验证。(2)合理的精密度评价周期,例如:为期至少 12 d 的检测,每天至少由 2 人完成不少于 2 次的完整检测,从而对批内/批间、日内/日间,以及不同操

作者之间的精密度进行综合评价。如有条件,申请人应选择不同的实验室进行重复实验,以对室内精密度进行评价。

(3)建议将“结核分枝杆菌菌株与临床阴性痰样本混合物”作为样本,在以下 3 个浓度水平进行验证,具体方法可参考本指导原则的“最低检测限的确定”部分内容:①阴性样本:不含分析物的样本,阴性检出率应为 100%(检测次数 ≥ 20)。②弱阳性样本:待测物浓度略高于试剂盒的最低检测限,阳性检出率应高于 95%(检测次数 ≥ 20)。③中等阳性样本:待测物浓度约为最低检测限的 2 倍或 3 倍,阳性检出率为 100%(检测次数 ≥ 20)。

反应性(包容性)

应证明检测试剂可以检测代表世界不同基因多态性的结核分枝杆菌复合群菌株。应采用略高于最低检出限浓度的结核分枝杆菌复合群菌株进行研究。应能够提供各个菌株的来源、菌株特性及浓度确认试验等信息。应采用权威的科研机构认可的标准参考方法:如结核分枝杆菌多位点的数目可变串联重复序列(mycobacterial interspersed repetitive unit-variable number of tandem repeat, MIRU-VNTR);间隔区寡聚核苷酸分型技术(Spoligotyping)确认菌株特性。需提交科学文献,以证明所有采用的菌株含有目的靶基因。

对于某些难于培养或者因为生物安全性原因无法培养的菌株,可采用菌株的核酸提取样本进行包容性的验证。

参 考 文 献

- [1] 马巧,朱莉贞,潘毓萱. 结核病. 北京:人民卫生出版社,2006.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 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). 2014-07-30.
- [3] U. S. Food and Drug Administration. Class II special controls guideline: nucleic acid-based in vitro diagnostic devices for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens—Guideline for Industry and Food and Drug Administration Staff [S/OL]. (2014-05-30) [2014-12-15]. <http://www.fda.gov/medicaldevices/deviceregulationandguidance/guidancedocuments/ucm357617.htm>.
- [4] 高诗会,赵英伟,胡忠义,等. 鉴别结核分枝杆菌复合群的新型核酸扩增检测靶标评价. 中华结核和呼吸杂志,2012,35(12):907-910.
- [5] Bloemberg GV, Voit A, Ritter C, et al. Evaluation of Cobas TaqMan MTB for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* Complex in comparison with Cobas Amplicor MTB. J Clin Microbiol, 2013, 51(7):2112-2117.
- [6] Lu PL, Lin YC, Yang YC, et al. Evaluation of a membrane array for detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in positive liquid cultures. Diagn Microbiol Infect Dis, 2013, 75(4):337-341.
- [7] Hwang SM, Lim MS, Hong YJ, et al. Simultaneous detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex and nontuberculous mycobacteria in respiratory specimens. Tuberculosis (Edinb), 2013, 93(6):642-646.

(收稿日期:2014-04-14)

(本文编辑:薛爱华)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

《中国防痨杂志》关于电子文献著录的格式要求

著录格式:主要责任者. 题名[文献类型标志/文献载体标志,是必选著录项目]. 出版地:出版者,出版年(更新或修改日期)[引用日期]. 获取和访问途径.

1. 在线数据库:举例如下。

[52] Who's Certified [DB/OL]. Evanston (IL): The American Board of Medical Specialists, 2000 [2001-05-08]. <http://www.abms.org/newsearch.asp>.

[53] Jablonski S. Online multiple congenital anomaly/mental retardation (MCA/MR) syndromes [DB/OL]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US). 1999(2001-11-20)[2002-12-12]. http://www.nlm.nih.gov/mesh/jablonski/syndrome_title.html.

2. 电子公告:举例如下。

[54] 萧钰. 出版业信息化迈入快车道[EB/OL]. (2001-12-19) [2002-04-15]. <http://www.creader.com/news/20011219/200112190019.html>.

[55] OCLC Online Computer Library Center, Inc. History of OCLC [EB/OL]. [2006-04-08]. <http://www.oclc.org/about/history/default.htm>.

3. 计算机程序:注意此文献的出版地和出版者的表示。

[56] Scitor Corporation. Project scheduler [CP/DK]. Sunnyvale, Calif.: Scitor Corporation, 1983.

不同文献类型的标志代码为:普通图书:M;会议录:C;汇编:G;报纸:N;期刊:J;学位论文:D;报告:R;标准:S;专利:P;数据库:DB;计算机程序:CP;电子公告:EB. 电子文献载体及其标志代码:磁带(magnetic tape):MT;磁盘(disk):DK;光盘(CD-ROM):CD;联机网络(online):OL。

注:专著、论文集中析出文献[A],其他未说明的文献类型[Z]。

本刊编辑部