

受理号：CSZ1900183

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：幽门螺杆菌 23S rRNA 基因与 gyrA 基因突变

检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：江苏默乐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

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.....	12
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

江苏默乐生物科技股份有限公司

二、申请人住所

江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F-7F 东

三、生产地址

泰州市药城大道 G02 厂房，R19 楼；江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F、7F 东

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

检测缓冲液、引物探针、混合酶液、强阳性质控品、弱阳性质控品、阴性质控品。(具体详见说明书)

(二) 产品预期用途

用于检测人胃黏膜组织样本中幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2143G、A2143C 和 A2144G 突变和 gyrA 基因 261A、261G、260T、271A、271T、272G 突变。

本试剂盒用于幽门螺杆菌克拉霉素耐药(23S rRNA 基因突变)和喹诺酮类抗生素耐药(gyrA 基因突变)的临床辅助诊断,为临床医生评估个体中幽门螺杆菌的耐药性提供参考。试剂盒适用于幽门螺杆菌感染者且临床认为有必要采用胃粘膜组织进行幽门螺杆菌耐药诊断的患者。未与具体药品进行相关临床试验,本试剂盒检测结果仅供临床参考,不得作为确诊或排除的唯一依据。

(三) 产品包装规格

50 测试/盒

(四) 产品检验原理

采用聚合酶链式反应（PCR）结合Taqman荧光探针技术对人胃黏膜组织样本中的幽门螺杆菌及耐药突变的鉴别检测。针对幽门螺杆菌克拉霉素耐药基因（23S rRNA基因）与喹诺酮类抗生素耐药基因（gyrA基因）的突变位点设计引物探针，采用FAM荧光标记克拉霉素耐药基因突变，采用HEX荧光标记喹诺酮类抗生素耐药基因突变。包含与克拉霉素耐药相关的23S rRNA基因的3种突变和与喹诺酮类抗生素耐药相关的gyrA基因的6种突变

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

本产品的主要原材料包括：引物、探针、HS Taq DNA 聚合酶、UNG 酶、dNTPs、质粒等，这些原材料均通过外购的方式获得。引物和探针均由申请人自行设计后，由专业的合成公司合成。申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性实验筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

企业参考品设置情况：申请人设计了完整的企业参考品，包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品、精密度参考品以及突变检测限参考品。企业参考品的主要原料为幽门螺杆菌菌液、临床样本核酸、质粒等。参考品组成如下：

Hp 阳性参考品 10 份；Hp 阴性参考品 10 份；包含所有位点的最低检测限参考品 30 份；Hp 精密度参考品 1 份；突变检测限参考品 18 份。以上企业参考品均含有一定浓度的人类基因组 DNA 作为内标。

企业参考品所采用临床样本采用基因测序的方法进行确认。企业参考品用于产品特异性、灵敏度、最低检测限、精密度及突变检测限检测。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人根据试剂盒中试剂及成分的主要生产工艺研究结果，确定了最佳的生产工艺。试剂盒反应体系的研究中，包含了临床样本的核酸提取与 PCR 扩增反应等。其中核酸提取研究包括核酸纯度、核酸完整性、重复性以及取样部位、取样大小等。PCR 扩增的反应体系研究包括引物探针浓度、dNTPs 浓度、DNA 聚合酶浓度、镁离子浓度、BSA 浓度、丙三醇浓度以及 PCR 反应程序优化等。通过一系列功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。

(三) 分析性能评估

该产品分析性能包括灵敏度、准确度、特异性（交叉反应、干扰物质）、精密度等。此外，还研究了配套使用的核酸提取试剂的性能。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 ABI7500 荧光 PCR 仪与上海宏石 SLAN-96P 上进行的性能评估资料。

在灵敏度的性能评估中，进行了最低检测限与突变率检测限的确定和验证。

最低检测限的确定和验证：申请人采用临床样本培养物对每个突变位点分别建立检出限。选取分别具有 23S rRNA 基因 2143C、2143G 和 2144G，gyrA 基因 261G、261A、260T、271A、271T 和 272G 突变的菌液，每种突变菌株分别稀释至不同浓度，使用 3 批试剂对每一浓度重复检测 20 次，以此确定试剂盒的最低检出限，结果显示：具有 95% 以上阳性检出率的样本浓度均不高于 $1 \times 10^4 \text{copies/mL}$ 。申请人进一步选取 10 例具有不同突变类型的临床培养物，并使用幽门螺杆菌阴性样本稀释至 $1 \times 10^4 \text{copies/mL}$ ，在稀释物中添加不同干扰物质后再检测，结果显示，在存在干扰物质的情况下，试剂盒的最低检出限仍然为 $1 \times 10^4 \text{copies/mL}$ 。

突变检测限的确定和验证：申请人将不同浓度、具有不同突变类型的核酸与野生核酸按照不同比例进行混合。核酸浓度为 $1 \text{pg}/\mu\text{L}$ 时，设置突变比例分别为 10%、0.1% 和 0.001%，浓度为 $0.001 \text{pg}/\mu\text{L}$ 时，设置突变比例为 80%、50% 和 10%。每种混合核酸均进行 20 次重复，结果显示，当野生型幽门螺杆菌浓

度为 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ ，各突变位点具有 90% 以上阳性检出率的最低突变比例为 0.1%；当野生幽门螺杆菌浓度为 $0.001\text{pg}/\mu\text{L}$ ，各突变位点具有 90% 以上阳性检出率的最低占比为 50%。申请人进一步将经测序方法验证过的、具有不同突变类型的核酸与野生型核酸混合按照一定比例混合后进行检测，用以验证突变检测限。结果显示：当野生型幽门螺杆菌浓度为 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ ，0.1% 突变比例条件下，各突变位点均能 100% 检出；当野生幽门螺杆菌浓度为 $0.001\text{pg}/\mu\text{L}$ ，50% 突变比例条件下，各突变位点均能 100% 检出。

在准确度的性能评估中，使用 3 批试剂对企业阳性参考品和阴性参考品进行检测。检测结果表明，阳性符合率和阴性符合率均为 100%。

在交叉反应的性能评估中，使用 3 批试剂检测胃肠道常见的其他病原微生物，如蜡样芽孢杆菌、肺炎克雷伯杆菌肺炎、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、类志贺邻单胞菌、流感嗜血杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、大肠杆菌、空肠弯曲菌、变形杆菌、白色念珠菌、粪肠球菌等，检测结果均为阴性。

在干扰物质的性能评估中，采用向弱阳性样本中加入干扰物质的方法进行验证，实验结果显示，常见干扰物质如血红蛋白 (1000.0 mg/L)、粘蛋白 (2000.0 mg/L)、白细胞 (10^9 个/L)、

阿莫西林 (0.75mg/L)、克拉霉素 (0.29mg/L)、左氧氟沙星 (1.62mg/L)、四环素 (5.0mg/L)、甲硝唑 (40.0mg/L)、奥美拉唑 (0.4mg/L)、雷贝拉唑 (0.802mg/L)、兰索拉唑 (1.15mg/L)、泮托拉唑 (3.81mg/L)、枸橼酸铋钾 (67.85mg/L)、阿司匹林 (300.0mg/L)、对乙酰氨基酚 (13.824mg/L)、铝碳酸镁 (1500.0mg/L)、乳酸菌素 (3600.0mg/L) 和胃康灵 (100.0mg/L) 等在上述浓度时对本试剂的检测结果没有影响。

在精密度的性能评估中,选择 10 例具有不同突变类型的样本,并稀释至不同浓度,在 20 天内,每天由 2 人分别进行 2 个轮次的检测,每一次检测做 3 个重复。检测结果显示:批内、批间、日内、日间、仪器间以及操作者间的变异系数 CV 均小于 5%。

本次申报产品包括 1 种包装规格 (50 测试/盒), 2 种实时荧光定量 PCR 仪适用机型 (ABI7500 与上海宏石 SLAN-96P), 申请人提供了三批产品在适用机型上的性能评估资料。

(四) 阳性判断值研究

申请人选取胃粘膜组织临床样本, 包含 23S rRNA 基因 2143C/2143G/2144G 和 gyrA 基因 261G/261A/260T/271A/271T/272G 不同突变的样本, 对检测结果进行 ROC 曲线分析, 结果显示: 幽门螺杆菌克拉霉素耐药基因突变检测 FAM 荧光 Ct 值

的参考值为 35.04；幽门螺杆菌喹诺酮类抗生素耐药基因突变 HEX 荧光 Ct 值的参考值为 35.73。本试剂盒使用人源基因作为试剂盒内标，确定内标 CY5 荧光 Ct 值的参考值为 32.00。同时，将本试剂盒检测结果进一步与临床培养药敏实验结果进行了比较，验证了试剂阳性判断值的合理性。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、运输稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性、胃黏膜组织样本的稳定性以及核酸的稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

实时稳定性的研究：采用三批试剂进行研究，将本试剂盒避光密闭保存在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别在第 0、1、2、3、6、9、12、13 月取出检测，检测的样本类型包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、精密度参考品等企业参考品，以从准确度、特异性、检测限、精密度等方面综合验证试剂盒的稳定程度。检测结果表明，各项性能指标均符合要求，确定产品在规定的储存条件下，可稳定保存 12 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性、样本及核酸稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均满足产品说明书的声称。

三、临床评价概述

申请人在南昌大学第一附属医院、南方医科大学南方医院、湖州市中心医院、山西省人民医院和四川大学华西医院共 5 家临床试验机构完成了临床试验。

临床试验主要包括两部分内容：

第一部分，采用试验用体外诊断试剂与幽门螺杆菌克拉霉素和喹诺酮类抗生素体外药敏实验（E-test）进行比较研究，共计入组 801 例幽门螺杆菌感染受试者样本（幽门螺杆菌培养阳性），其中药敏实验检出克拉霉素耐药菌株 562 例，克拉霉素敏感菌株 239 例，研究结果显示，试验用体外诊断试剂临床灵敏度是 91.81%（95%CI: 89.25%~93.81%），临床特异度是 80.33%（95%CI: 74.83%~84.88%）。药敏实验检出喹诺酮类抗生素耐药菌株 532 例，喹诺酮类抗生素敏感菌株 269 例，试验用体外诊断试剂临床灵敏度是 84.96%（95%CI: 81.67%~87.75%），临床特异度是 82.16%（95%CI: 77.14%~86.27%）。试验还对所有突变位点进行了单独统计，各位点与药敏结果符合率良好，且满足统计学意义。

第二部分，采用试验用体外诊断试剂与 Sanger 测序法进行对比试验。共计入组样本 1786 例，其中，测序检出 23S rRNA 基因的 3 种常见突变阳性 813 例，突变阴性 973 例，两种方法

的阳性符合率为 94.10% (95%CI: 92.26%~95.52%), 阴性符合率为 96.71%(95%CI: 95.39%~97.66%), 总符合率为 95.52% (95%CI: 94.46%~96.39%); 测序检出 *gyrA* 基因的 6 种常见突变阳性 675 例, 突变阴性 1111 例, 两种方法的阳性符合率为 93.48% (95%CI: 91.36%~95.11%), 阴性符合率为 94.42% (95%CI: 92.91%~95.62%), 总符合率为 94.06% (95%CI: 92.87%~95.07%)。考核试剂与 Sanger 测序法一致性良好。

综上, 临床试验结果显示, 本产品检测结果用于幽门螺杆菌克拉霉素和喹诺酮类抗生素耐药的辅助诊断, 灵敏度、特异度良好, 基本满足临床需求。

四、产品受益风险判定

(一) 受益评估

目前认为幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是引起慢性活动性胃炎、十二指肠及胃溃疡的主要原因。另外, 根据目前多方面流行病学调查显示, 发现 Hp 除了与上消化道的慢性炎症、消化道溃疡、胃癌等疾病高度相关以外, 同时与许多胃肠道外疾病的发生、发展有相当密切的关系。

目前对幽门螺杆菌的治疗主要采用含有抗生素的三联或四联疗法进行, 而随着抗生素的大量使用, 幽门螺杆菌已经出现了抗生素的耐药现象, 克拉霉素与喹诺酮类抗生素耐药率在

20%-50%之间。《第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》中指出：不论初次治疗或补救治疗，如需选择含克拉霉素、甲硝唑或左氧氟沙星的三联方案，应进行药物敏感试验。有研究表明，基于药敏试验的多重疗法相比于经验性的用药，Hp 的根除率从 63%提高至 86%，但培养有一定技术要求，敏感性偏低，因此不推荐单纯用于 Hp 感染的常规诊断。我国《第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》指出：分子生物学可用于 Hp 耐药位点的检测，并明确认为该方法学对 Hp 耐药基因突变的检测具有临床应用价值。

本试剂检测幽门螺杆菌感染患者胃粘膜组织样本中的幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种常见突变 2143C、2143G 和 2144G，gyrA 基因 6 种常见突变 261G、261A、260T、271A、271T 和 272G。用于幽门螺杆菌克拉霉素和喹诺酮类抗生素耐药的临床辅助诊断，为临床医生评估个体中幽门螺杆菌的耐药特性提供参考。临床应用的主要受益在于：对于幽门螺杆菌感染者需要进行克拉霉素和喹诺酮类抗生素药物敏感性评价的，提供除细菌药敏试验外的一种分子生物学方法的选择。特别是可以弥补幽门螺杆菌培养敏感性不足的问题。幽门螺杆菌阳性可以及时治疗，耐药阳性患者可以避免使用克拉霉素或喹诺酮类抗生素治疗导致的失败，从而提高幽门螺杆菌的根除

率。经临床评价，该产品对克拉霉素耐药幽门螺杆菌菌株感染患者的检出灵敏度是 94.10%，对喹诺酮类抗生素耐药幽门螺杆菌菌株感染患者的检出灵敏度是 93.48%。

（二）风险评估

该产品主要的风险来自于检测存在假阴性情况，如对克拉霉素耐药幽门螺杆菌菌株感染患者检测结果为阴性，则可能导致患者使用克拉霉素进行治疗，进一步导致治疗失败，经临床研究，本检测假阴性的概率是 5.90%。如对喹诺酮类抗生素幽门螺杆菌菌株感染患者检测结果为阴性，则可能导致患者使用喹诺酮类抗生素进行治疗，进一步导致治疗失败，经临床研究，本检测假阴性的概率是 6.52%。

（三）风险收益评价结论

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，认为该产品能够较大程度地满足医疗需求，预期为适用人群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，需在说明书中提示以下信息：

采用本试剂盒进行检验得到的结果仅供临床参考，不作为治疗或其它临床管理的唯一依据。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，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 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。

2022 年 1 月 24 日

附件：产品说明书

幽门螺杆菌 23S rRNA 基因与 gyrA 基因突变检测试剂盒

(荧光 PCR 法) 说明书

【产品名称】

通用名称: 幽门螺杆菌 23S rRNA 基因与 gyrA 基因突变检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【包装规格】

50 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于检测人胃黏膜组织样本中幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2143G、A2143C 和 A2144G 突变和 gyrA 基因 261A、261G、260T、271A、271T、272G 突变。

本试剂盒用于幽门螺杆菌克拉霉素耐药 (23S rRNA 基因突变) 和喹诺酮类抗生素耐药 (gyrA 基因突变) 的临床辅助诊断, 为临床医生评估个体中幽门螺杆菌的耐药性提供参考。试剂盒适用于幽门螺杆菌感染者且临床认为有必要采用胃粘膜组织进行幽门螺杆菌耐药诊断的患者。未与具体药品进行相关临床试验, 本试剂盒检测结果仅供临床参考, 不得作为确诊或排除的唯一依据。

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 在世界范围内广泛流行, 全世界大约有 50% 的人有幽门螺杆菌感染史, 而我国幽门螺杆菌的感染率在 40%~70%。幽门螺杆菌主要引起消化系统相关疾病, 如慢性胃炎、胃溃疡与十二指肠溃疡等。目前, 临床上主要采用含抗生素的三联或四联疗法来治疗幽门螺杆菌感染, 而抗生素的大量使用导致幽门螺杆菌产生耐药性, 幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2143G、A2143C 和 A2144G 突变与克拉霉素耐药相关, gyrA 蛋白 87 位天冬酰胺到赖氨酸/异亮氨酸突变、gyrA 蛋白 91 位天冬氨酸到天冬酰胺/酪氨酸/甘氨酸突变与喹诺酮类抗生素耐药相关。因此, 幽门螺杆菌及其耐药性的检测对临床用药具有指导意义。

检验人员应具备 PCR 检测操作资质。由于幽门螺杆菌属于危害程度第三类的病原微生物, 因此在保证安全的前提下, 对临床和现场的未知样本检测操作在生物安全 II 级或以上防护级别的实验室进行。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应 (PCR) 结合 Taqman 荧光探针技术对人胃黏膜组织样本中的幽门螺杆菌耐药突变进行鉴别检测。

本试剂盒针对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因与克拉霉素耐药相关 3 种突变位点及与 gyrA 基因与喹诺酮类抗生素耐药相关 6 种突变位点设计引物探针 (突变位点信息如表 1 所示), 采用 FAM 荧光标记 23S rRNA 基因突变, 采用 HEX 荧光标记 gyrA 基因突变。针对 16S rRNA 基因设计引物探针, 作为内部阳性质控, 采用 ROX 荧光标记; 针对人 β -actin 基因设计引物探针, 作为试剂盒内标, 采用 CY5 荧光标记。

表 1 幽门螺杆菌 23S rRNA 基因与 gyrA 基因耐药突变位点

23S rRNA 基因	gyrA 基因		
核苷酸变化	突变名称	核苷酸变化	氨基酸变化
AAA>CAA	Asn87Lys	AAT>AAG	天冬酰胺到赖氨酸
		AAC>AAA	
AAA>GAA	Asn87Ile	AAT>ATT	天冬酰胺到异亮氨酸
	Asp91Asn	GAT>AAT	天冬氨酸到天冬酰胺
AAA>AGA	Asp91Tyr	GAT>TAT	天冬氨酸到酪氨酸
	Asp91Gly	GAT>GGT	天冬氨酸到甘氨酸

【主要组成成分】

序号	标签	成份	数量 (50 测试/盒)
1	检测缓冲液 (Hp)	含氯化镁、dNTPs、水等	1 管 (700 μ L/管)
2	引物探针 (Hp)	含目的基因引物、探针等	1 管 (400 μ L/管)
3	混合酶液 (Hp)	含 UNG 酶、聚合酶	1 管 (28 μ L/管)
4	强阳性质控品 (Hp)	含 Hp 目的基因及突变基因等	1 管 (500 μ L/管)
5	弱阳性质控品 (Hp)	含 Hp 目的基因及突变基因等	1 管 (500 μ L/管)
6	阴性质控品(Hp)	含人 β -actin 基因的质粒	1 管 (500 μ L/管)

其他需要但未提供的试剂：核酸提取纯化试剂（生产厂家：江苏默乐生物科技股份有限公司，备案号：苏泰械备 20150076）。

注：不同批号试剂盒中各组分不能互换。

【储存条件及有效期】

包装后的试剂盒，贮存在 $-(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 冰箱内，保存期限是 12 个月。采用泡沫盒加冰袋或干冰密封进行运输。在 37°C 高温条件下能稳定储存 5 天，超过 5 天效果未验证；反复冻融 5 次稳定性良好，超过 5 次效果未验证；配置成反应体系后， $2-8^{\circ}\text{C}$ 条件下存放 3 天稳定性良好，超过 3 天效果未验证；使用时由于环境中可能存在气溶胶污染，导致 PCR 反应假阳性等原因，建议一次性使用。

生产日期和失效日期：见标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI 7500 和上海宏石 SLAN-96P 等实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

采集的样本为胃黏膜组织。

1 采集

取胃黏膜组织样本，置于样本保存管内，密封送检。采样时应首选病灶部位。

2 采样步骤

插镜后，操作者操纵活检钳瓣的开启，右手将钳头自活检阀门孔缓慢送入，当钳头进入视野后，张开钳瓣，操纵内镜，使活检钳在采样部位胃黏膜处，稍加压，关闭活检钳，夹取胃黏膜组织，抽出钳子，将取得的组织样本置于样本保存管内。

3 注意事项

样本采集过程中注意无菌操作。请使用一次性活检钳，避免交叉感染。取样时，活检钳应尽量下压深达黏膜全层；取出活检钳并打开活检器时要轻，防止黏膜撕裂。

4 完成采样后，旋紧样本保存管管盖并密封，以防干燥，外表贴上带有唯一识别号码的标签，密闭送检，外表贴上带有唯一识别号码的标签。

5 临床标本在运输和贮存过程中要避免反复冻融，如果不能确保 $-(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 的条件，应该在 $0-8^{\circ}\text{C}$ 运输。 $-(20\pm 5)^{\circ}\text{C}$ 保存期限是 5 个月（超过 5 个月效果未验证）， -70°C 及以下可以长期保存。运输和保存过程中要附有必要的信息，如标本编号、发病日期和标本采集日期。

【检验方法】

1 扩增试剂准备（PCR 前准备期）

采用江苏默乐生物科技股份有限公司的核酸提取纯化试剂（备案号：苏泰械备 20150076）。按照核酸提取纯

化试剂的说明书提取病原体核酸。抽提好的核酸应立即进行检测或置于-（20±5）℃长期保存。需要进行核酸提取的样本种类包括：

1.1 临床样本：待检测的临床样本；

1.2 质控品：试剂盒中强阳性质控品（Hp）、弱阳性质控品（Hp）和阴性质控品（Hp），取 50μL 上述 3 种质控品，分别与 50μL 裂解液（核酸提取纯化试剂，备案号：苏泰械备 20150076）混合，95℃加热 10min，12000rpm 离心 10min，转移上清至新的 Ep 管中，并做好标记。

2 扩增试剂准备（PCR I 室）

从试剂盒中取出引物探针和检测缓冲液，在冰上或2-8℃融化，取出混合酶液，将所有组分轻微摇晃混匀并低速简短离心。每人份按照下表进行PCR反应体系的配置。

试剂	检测缓冲液（Hp）	引物探针（Hp）	混合酶液（Hp）
用量（μL）	12.5	7.0	0.5

计算好各试剂使用量，加入一适当体积离心管中，充分混匀，简短离心。PCR反应液的总量应满足的人份数包括：临床样本的个数、1管强阳性质控品、1管弱阳性质控品、1管阴性质控品和1个PCR阴性对照。

PCR反应液配置完毕，进行PCR反应液的分装，在每一个PCR反应孔加入20.0μL PCR反应液，分装完毕，转移至PCR II 室。

3 加样（PCR II 室）

在装有PCR反应液的PCR反应孔中加入“1 扩增试剂准备（PCR前准备期）”步骤制备的核酸，每一份核酸的添加量是5.0μL/孔，PCR阴性对照孔中不添加任何样本或核酸。

4 PCR 反应（检测区）

将反应管放入荧光PCR检测仪中，循环参数设定如下：

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
1	1	42	02:00
2	1	95	02:00
3	40	95	00:10
		58	00:45

荧光信号的收集定为FAM（23S rRNA基因突变）、HEX/VIC（gyrA基因突变）、ROX（幽门螺杆菌）和CY5（内标），数据的采集定在58℃。采用ABI7500仪器时，请将“Quencher”一栏设置为“none”，“passive reference”一栏选为“none”。

【阳性判断值】

通过试验结果分析，利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒 FAM（23S rRNA 基因突变）荧光的参考值为 35.04，Ct 值≤35.04，表示 23S rRNA 基因突变；HEX/VIC（gyrA 基因突变）荧光的参考值为 35.73，Ct 值≤35.73，表示 gyrA 基因突变。

【检验结果的解释】

反应结束后，仪器自动保存结果，分析图像后调节Baseline的Start值、End值和Threshold值（可自行调节，Start值可以在3-15之间，End值可以位于5-20之间），调整PCR阴性对照的扩增曲线使其平直或低于阈值线。

强阳性质控品 FAM、HEX/VIC 和 ROX 的 Ct 值≤25.00；弱阳性质控品 FAM、HEX/VIC 和 ROX 的 Ct 值≤35.00；阴性质控品 FAM、HEX/VIC 和 ROX 的 Ct 值应为阴性；PCR 阴性对照孔应检出为阴性，即仪器检测结果不显示 Ct 或 Ct>35.00 或无典型 S 扩增曲线。以上条件需要在同一次试验中同时满足，否则认为 PCR 反应无效，需要重新进行检测。

1 在质控品检测符合要求的情况下，如样本内标 CY5 的 Ct 值>32.00，则需重新抽提该样本后再进行检测。

2 在质控品检测符合要求的情况下，样本内标 CY5 的 Ct 值≤32.00，待检样本 ROX（内部阳性质控）荧光

Ct>35.00 或没有 Ct 值或无典型 S 型扩增曲线时，试剂盒基因突变检测结果无效。

3 在质控品检测符合要求的情况下，样本内标CY5的Ct值≤32.00，待检样本ROX(内部阳性质控)荧光Ct≤35.00且呈典型S型扩增曲线时，进行有无基因突变的判断，具体如下表所示：

待检样本实时荧光 PCR 检测结果				鉴定结果		
CY5 荧光	ROX 荧光	FAM 荧光	HEX/VIC 荧光	幽门螺杆菌	23S rRNA 基因 2143C、2143G 和/或 2144G 突变	gyrA 基因 260T、261G、261A、271A、271T 和/或 272G 突变
≤32.00	≤35.00	>35.04	>35.73	阳性	无突变	无突变
≤32.00	≤35.00	≤35.04	>35.73	阳性	突变	无突变
≤32.00	≤35.00	>35.04	≤35.73	阳性	无突变	突变
≤32.00	≤35.00	≤35.04	≤35.73	阳性	突变	突变

4 试剂盒检测扩增图及分析示例。

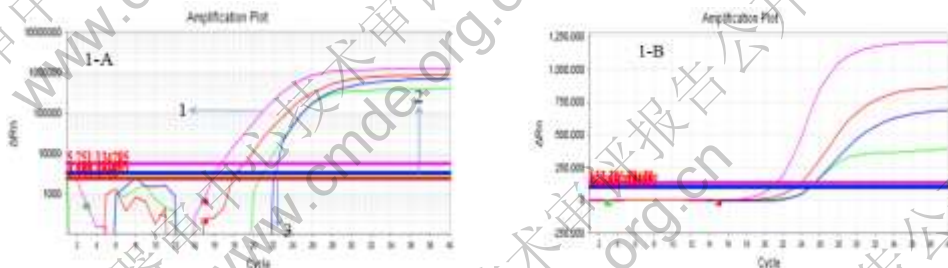


图 1：扩增曲线图示。1-A：指数扩增图，“1”：扩增曲线，“2”阈值线，“3”CT 值。图 1-B：线性扩增图。

【检验方法的局限性】

采用本试剂盒进行检验得到的结果仅供临床参考，不作为治疗或其它临床管理的唯一依据；最适样本类型未经验证，因此，在同一患者分次、多部位采集样本可能会避免假阴性结果；样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将导致假阴性结果。不合理的样本采集、运输和处理、样本中细菌浓度过低均有可能导致假阴性结果；靶序列的变异会导致假阴性结果；可能会导致假阴性结果的未经验证的其它干扰因素包括：患者同时患有其它疾病时，其它疾病的病理代谢产物及针对其的治疗药物等因素。

【产品性能指标】

1 企业参考品符合率：10 份阴性参考品的阴性符合率为 10/10；10 份阳性参考品的阳性符合率为 10/10。

2 最低检出限：当样本浓度过低时（≤10 拷贝/μL），20 次重复检验不能 100%检出阳性。

3 精密度：本试剂盒批内精密度 CV≤5%，批间精密度 CV≤5%。

4 分析特异性

4.1 交叉反应：本试剂盒检测胃肠道常见的其他病原微生物（如蜡样芽孢杆菌、肺炎克雷伯杆菌肺炎、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、类志贺邻单胞菌、流感嗜血杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌、铜绿假单胞菌、脑膜炎奈瑟菌、结核分枝杆菌、大肠杆菌、空肠弯曲菌、变形杆菌、白色念珠菌、粪肠球菌等）无交叉反应。

4.2 干扰物质：当常见干扰物质如血红蛋白、粘蛋白与白细胞浓度不大于 1000.0 mg·L⁻¹、2000.0 mg·L⁻¹ 和 10⁹ 个/L 时，不会对样本检测结果产生影响。

4.3 药物影响：当检验样本中含有以下浓度的药物时，不会对试剂盒检测效果产生影响：阿莫西林、克拉霉素、左氧氟沙星、四环素、甲硝唑、奥美拉唑、雷贝拉唑、兰索拉唑、泮托拉唑和枸橼酸铋钾、阿司匹林、对

乙酰氨基酚、铝碳酸镁、乳酸菌素、胃康灵，在检验样本中浓度分别是 $0.75\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.29\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.62\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $5.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $40.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.4\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.802\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1.15\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3.81\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $67.85\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $300.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $13.824\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $1500.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $3600.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $100.0\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

5 突变检测限：幽门螺杆菌浓度为 $1\text{pg}/\mu\text{L}$ 时，突变菌占比 $\geq 0.1\%$ 能够被检出；幽门螺杆菌浓度为 $0.001\text{pg}/\mu\text{L}$ 时，突变菌占比 $\geq 50\%$ 能够被检出。

6 临床试验：在 5 家临床机构完成 1786 例临床样本检测，与测序方法进行对比，克拉霉素耐药的阳性符合率为 94.10% （95%CI: $92.26\%\sim 95.52\%$ ），阴性符合率为 96.71% （95%CI: $95.39\%\sim 97.66\%$ ），总符合率为 95.52% （95%CI: $94.46\%\sim 96.39\%$ ）；喹诺酮类抗生素耐药的阳性符合率为 93.48% （95%CI: $91.36\%\sim 95.11\%$ ），阴性符合率为 94.42% （95%CI: $92.91\%\sim 95.62\%$ ），总符合率为 94.06% （95%CI: $92.87\%\sim 95.07\%$ ）；将其中 801 例临床样本的检测方法与药敏实验结果进行对比，克拉霉素耐药的临床灵敏度是 91.81% （95%CI: $89.25\%\sim 93.81\%$ ），临床特异度是 80.33% （95%CI: $74.83\%\sim 84.88\%$ ）；喹诺酮类抗生素耐药的临床灵敏度是 84.96% （95%CI: $81.67\%\sim 87.75\%$ ），临床特异度是 82.16% （95%CI: $77.14\%\sim 86.27\%$ ）。

【注意事项】

1 整个检测过程应分三区进行，一区进行试剂准备；二区进行标本处理、反应体系的配制；三区进行扩增、荧光检测和结果分析。各区的仪器、设备和工作服独立使用，以防污染。

2 在操作中，应时刻注意避免 RNase 的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性薄壁进口 $200\mu\text{L}$ PCR 管（或 96 孔 PCR 板加光学贴膜）、移液器头（带滤嘴自卸式），不能用手直接接触反应管。

3 处理标本时应使用生物安全柜，以保证操作人员安全和防止对环境的污染。实验中的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置专门容器中妥善处理。操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用 1.0% 次氯酸钠及/或 70% 乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。

4 离心管装试剂在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离心管底部。配制反应体系时应注意：所有液体的混匀尽量要在漩涡混合器上进行，不用移液器吹打，免产生气泡，反应体系配制完毕低速离心数秒。试剂盒请在保质期内使用。不同批号的试剂请勿混用。

【参考文献】

[1] Yamaoka Y. Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2010,7(11):629-641.

[2] O'Morain C, Montague S. Challenges to therapy in the future[J]. *Helicobacter*, 2000, 5(S1): 23-26.

[3] Megraud F. H. *pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing[J]. *Gut*. 2004, 53(9): 1374-1384.

[4] Kim JM, Kim JS, Kim N, et al. Gene mutations of 23SrRNA associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from Korean patients[J]. *Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2008, 18(9): 1584-1589.

[5] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Novel mutation in 23SrRNA that confers low-level resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori*[J]. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2008, 52(9): 3465-3466.

[6] Boyanova L, Mitov I. Geographic map and evolution of primary *Helicobacter pylori* resistance to antibacterial agents. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010, 8(1):59-70.

[7] Binh TT, Shiota S, Nguyen LT, et al. The incidence of primary antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* in Vietnam. *J Clin Gastroenterol*. 2013, 47(3):233-238.

[8] De Francesco VI, Giorgio F, Hassan C, et al. Worldwide H. *pylori* antibiotic resistance: a systematic review. *J Gastrointest Liver Dis*. 2010, 19(4):409-414.

[9] Cattoir V, NeCtoux J, Lascols C, et al. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new

mutations leading to resistance and first description of a gyrA polymorphism associated with hypersusceptibility[J]. International Journal of Antimicrobial Agent. 2007, 29(4): 389-396.

[10] Wang LH, Cheng H, Hu FL, et al. Distribution of gyrA mutations in fluoroquinolone-resistant Helicobacter pylori strains[J]. World Journal of Gastroenterology. 2010, 16(18): 2272-2277.

[11] Garcia M, Raymond J, Garnier M, et al. Distribution of spontaneous gyrA mutations in 97 fluoroquinolone-resistant Helicobacter pylori isolates collected in France[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2012, 56(1): 550-551.

[12] Rimbara E, Noguchi N, Kawai T, et al. Fluoroquinolone resistance in Helicobacter pylori: role of mutations at position 87 and 91 of GyrA on the level of resistance and identification of a resistance conferring mutation in GyrB[J]. Helicobacter. 2012, 17(1): 36-42.

[13] Lee JW1, Kim N, Kim JM, et al. Prevalence of primary and secondary antimicrobial resistance of Helicobacter pylori in Korea from 2003 through 2012. HelicobaCTer. 2013, 18(3):206-214.

[14] Gao W, Cheng H, Hu F, et al. The evolution of Helicobacter pylori antibiotics resistance over 10 years in Beijing, China. HelicobaCTer. 2010, 15(5):460-466.

[15] Gerrits MM, de Zoete MR, Arents NL, et al. 16S rRNA mutation-mediated tetracycline resistance in Helicobacter pylori[J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2002, 46(9): 2996-3000.

[16] Gerrits MM, van Vliet AH, Kuipers EJ, et al. Helicobacter pylori and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet InfeCT Dis. 2006, 6(11):699-709.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏默乐生物科技股份有限公司

住 所：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F-7F 东

联系方式：

售后服务单位：

联系方式：

生产地址：泰州市药城大道 G02 厂房，R19 楼；江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F、7F 东

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】