

受理号：CSZ2300045

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：结核分枝杆菌利福平及异烟肼耐药突变检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：厦门致善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.....	6
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

厦门致善生物科技股份有限公司

二、申请人住所

厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼

三、生产地址

厦门火炬高新区（翔安）产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
及 11 号楼 3 层 A 区、4 层

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本产品由扩增试剂、对照试剂和耗材组成，主要组成成分见表 1。

表 1 主要组成成分

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	耐药 PCR 反应管 A	引物、探针、dNTPs、 Taq 酶、UNG 酶	8 测试/条	6 条
	耐药 PCR 反应管 B	引物、探针、dNTPs、 Taq 酶、UNG 酶	8 测试/条	6 条
对照试剂	耐药阳性对照	野生型靶基因质粒	12 测试/支	1 支
	耐药阴性对照	三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸 二钠 (EDTA• 2Na)	12 测试/支	1 支
耗材	PCR 八联管管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	12 条

注：建议不同批号组分之间不互换。核酸提取试剂未包含在本试剂盒中。

（二）产品预期用途

用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本和培养物样本中的利福平和异烟肼耐药相关的基因突变。本产品通过检测结核分枝杆菌复合群 *rpoB* 基因 507~533 共 27 个氨基酸密码子区域内 (81bp, 利福平耐药决定区) 的突变进行利福平耐药基因突变检测; 通过检测 *ahpC* 启动子区 (-44~-30 位点以及 -15~4)、*inhA* 启动子区 (-17~-8 位点) 以及 *katG315* 密码子的突变进行异烟肼耐药基因突变检测。本产品无法明确具体突变类型。

可用于利福平和异烟肼耐药结核病的辅助诊断。

（三）产品包装规格

48 测试/盒。

（四）产品检验原理

采用荧光 PCR 熔解曲线法, 其基本原理是: 在 PCR 体系中加入两端分别标记有荧光基团与淬灭基团的探针, 在 PCR 过程中扩增出与探针序列互补的单链寡核苷酸序列, 在扩增完成后增加熔解曲线分析过程, 同时实时监测荧光值的变化, 通过计算荧光值与温度的负导数, 可获得探针与该序列杂交产物的熔解曲线, 并得出 T_m 值 (熔点), 从而推得该序列突变信息。如果靶序列与探针完全匹配, 则探针与该序列杂交的 T_m 值最高; 如

果探针与序列不完全匹配，例如序列发生点突变、插入或者缺失，则探针与该序列杂交的 T_m 值低于探针与完全匹配序列杂交的 T_m 值。 T_m 值的降低程度与点突变类型、插入或缺失碱基数量以及突变位点的位置有关。

二、临床前研究概述

该产品技术审评依据原国家食品药品监督管理总局通告（2017 年第 25 号）《结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂注册技术审查指导原则》的相关要求。

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品主要原材料包括引物、探针、聚合酶、UNG 酶、dNTPs、质粒原料等。主要原材料聚合酶和质粒原料为自产，其他原材料均为外购。引物、探针为申请人自行设计后由专业合成公司合成。申请人选择有资质的供应商提供原料，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. 企业参考品和对照品的设置情况

本产品企业参考品包括突变型参考品、野生型参考品、检测限参考品、异质性参考品和精密度参考品。参考品采用真实菌株样本和核酸样本制备而成，包括突变型参考品、野生型参

考品、检测限参考品、异质性参考品、精密度参考品。

本产品设置了阳性对照品和阴性对照品各 1 份，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。其中阳性对照品为野生型靶基因质粒 DNA 构成，阴性对照品为不含任何靶基因的溶液。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人对反应体系中引物、探针、聚合酶、UNG 酶和 dNTPs 等的浓度和用量进行了优化，并对反应体系的扩增程序、预变性时间、退火时间、延伸温度和时间、扩增循环数、样本用量等进行了优化和验证。此外，对样本核酸的提取方法和取样量进行了验证，通过功能性试验，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：准确度、精密度、最低检测限、分析特异性、适用机型与核酸提取试剂性能等研究。

准确度研究中，申请人使用三批以上成品试剂盒，检测 12 份阴性（野生型）样本和 33 份阳性（突变型）样本。结果表明阳性符合率和阴性符合率均为 100%，试剂盒的准确性符合设计要求。

精密度研究中，申请人使用三批以上成品试剂盒，对两种

不同浓度（弱阳性样本、中等阳性样本）的不同型别的阳性样本和阴性样本，进行了重复性核酸提取和检测等在内的精密度研究，评估了试剂盒批内、批间及检测日内、日间、操作者间精密度。结果显示试剂盒批内/批间、日内/日间、不同操作者之间均有着很好的检测重复性，变异系数 CV 均不大于 1%，精密度良好，符合设计要求。

最低检测限研究中，申请人使用三批成品试剂盒，检测系列浓度梯度的野生/突变型样本及不同耐药比例的样本，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，并使用三批成品试剂盒检测 19 份临床菌株样本和 19 份制备痰液，以及 11 份 30%耐药比例的临床菌株样本和 11 份 30%耐药比例的制备痰液，进行最低检测限和耐药比例的最低检测限验证，最终确定该产品最低检测限为 10^3 菌/mL，异质性检测能力为 30%及以上的突变比例。

分析特异性研究中，申请人进行了交叉反应研究及干扰物质研究。在交叉反应研究中，申请人使用三批成品试剂盒，针对不同浓度的野生型结核分枝杆菌样本、各种突变型结核分枝杆菌样本、其他分枝杆菌（堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、土地分枝杆菌、次要分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、戈登分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、鸟分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、苏加分枝杆菌、

龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、偶然分枝杆菌、胃分枝杆菌、胞内分枝杆菌、草分枝杆菌等)样本及其他病原体(肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌、隐球菌、金黄色葡萄球菌、诺卡氏菌、绿脓杆菌、白色念珠菌等)样本进行了交叉反应评价。结果显示本试剂盒可正确检测野生型结核分枝杆菌和突变型结核分枝杆菌,与上述其他分枝杆菌和其他病原体不产生交叉反应。在干扰试验中,申请人使用三批成品试剂盒,对样本中的干扰物质(痰液、常见治疗药物等)进行了评价。结果显示内源性痰液和外源性药物利福平(9 mg/L)、异烟肼(12 mg/L)、乙胺丁醇(8 mg/L)、阿莫西林(11 mg/L)、羟甲唑啉(1 mg/L)、莫匹罗星(20 mg/L)、吡嗪酰胺(45 mg/L)、扎那米韦(0.5 mg/L)、地塞米松(20 mg/L)对本试剂检测不产生干扰。

适用机型研究中,全自动医用PCR分析系统(型号:SLAN-96S, SLAN-96P;上海宏石医疗科技有限公司)作为研究对象,申请人对试剂盒的阴/阳性参考品符合率、最低检测限、精密度等进行了评估,检测结果均符合试剂盒的设计要求,同时也满足临床的实际需求。

核酸提取试剂性能研究中,申请人使用临床样本比较评估了产品配套使用的核酸提取试剂盒的提取效果,结果显示配套

使用的核酸提取试剂盒的核酸提取效率满足产品使用需求。

(四) 阳性判断值或参考区间研究

申请人采用本产品和配套仪器对收集的野生型临床样本和突变型临床样本进行检测，获得试剂盒各检测通道的野生型和突变型的溶解峰 T_m 值，通过对相应样本的数据分布进行统计分析并计算标准偏差确定野生型样本和突变型样本的参考区间。

申请人进一步采用 93 例野生型临床样本和 271 例突变型临床样本进行了参考区间的验证，结果显示确定的参考区间符合率良好。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开封稳定性、冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性等进行了系统的研究，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：试剂盒分别储存于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 和 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 避光条件下，分别于第 0、3、6、9、12、15、18、20 个月对试剂盒的外观、野生型/突变型参考品符合率、最低检测限、精密度、阳性/阴性对照进行考察。结果显示试剂盒在 $-25 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 避光条件下，试剂盒可稳定保存 18 个月。

申请人对产品的开封稳定性、冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均能满

是产品说明书的声称。

三、临床评价概述

申请人在广州市胸科医院、福建省福州结核病防治院、山东省胸科医院共 3 家机构完成了临床试验。采用试验体外诊断试剂与临床参考标准（药敏法）比较研究试验，并同时采用一代测序对阳性样本进行测序，确认本产品的临床性能。试验体外诊断试剂涉及痰液和培养物 2 种样本类型，以及利福平和异烟肼两个药物相关的耐药基因。

针对痰液样本类型的利福平耐药基因突变检测，共纳入 618 例样本，其中阳性样本 150 例，阴性样本 468 例。试验结果显示，试验体外诊断试剂与临床参考标准的临床灵敏度为 98%（95%CI: 94.3%，99.3%），临床特异度为 95.9%（95%CI: 93.8%，97.4%），总符合率为 96.4%（95%CI: 94.7%，97.6%）。以上结果显示两者检测结果之间具有良好的一致性。

针对痰液样本类型的异烟肼耐药基因突变检测，共纳入 623 例样本，其中阳性 217 例，阴性 406 例。试验结果显示，试验体外诊断试剂与临床参考标准的临床灵敏度为 92.2%（95%CI: 87.8%，95.1%），临床特异度为 98.3%（95%CI: 96.5%，99.2%），总符合率为 96.2%（95%CI: 94.3%，97.4%）。以上结果显示两者检测结果之间具有良好的一致性。

针对培养物样本类型的利福平耐药基因突变检测，共纳入 722 例样本，其中阳性样本 334 例，阴性样本 388 例。试验结果显示，试验体外诊断试剂与临床参考标准的临床灵敏度为 98.8% (95%CI: 96.9%, 99.5%)，临床特异度为 98.2% (95%CI: 96.3%, 99.1%)，总符合率为 98.5% (95%CI: 97.3%, 99.2%)。以上结果显示两者检测结果之间具有良好的一致性。

针对培养物样本类型的异烟肼耐药基因突变检测，共纳入 723 例样本，其中阳性样本 364 例，阴性样本 359 例。试验体外诊断试剂与临床参考标准的临床灵敏度为 93.7% (95%CI: 90.7%, 95.8%)，临床特异度为 99.2% (95%CI: 97.6%, 99.7%)，总符合率为 96.4% (95%CI: 94.8%, 97.5%)。以上结果显示两者检测结果之间具有良好的一致性。

此外，通过一代测序对所有阳性样本进行了测序，结果显示，对于试验体外诊断试剂声称耐药基因区段的常见突变位点，本次临床试验均有检出。

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

依据 YY/T 0316-2016《医疗器械风险管理对医疗器械的应用》，对该产品进行风险分析。

(一) 受益评估

结核病是由结核分枝杆菌感染引起，严重危害人体健康的传染病。利福平、异烟肼药物是用于治疗结核病的一线抗结核药物，对结核分枝杆菌利福平和异烟肼的耐药性情况进行检测，对耐药结核病的诊疗具有较大的意义。本产品临床应用的主要受益在于：采用分子生物学方法，能较快地对结核病患者进行结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药性检测，以辅助临床对利福平和异烟肼耐药的耐药结核病的诊断。依据现有的临床试验结果，本产品对结核分枝杆菌利福平和异烟肼耐药检测的临床灵敏度和特异度良好。

（二）风险评估

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险，不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。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. 预期用途：本产品用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本和培养物样本中的利福平和异烟肼耐药相关的基因突变。本产品通过检测结核分枝杆菌

复合群 rpoB 基因 507 ~ 533 共 27 个氨基酸密码子区域内(81bp, 利福平耐药决定区)的突变进行利福平耐药基因突变检测; 通过检测 ahpC 启动子区 (-44 ~ -30 位点以及 -15 ~ 4)、inhA 启动子区 (-17 ~ -8 位点)以及 katG315 密码子的突变进行异烟肼耐药基因突变检测。本产品无法明确具体突变类型。

本产品可用于利福平和异烟肼耐药结核病的辅助诊断。

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，属于优先审批项目。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，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2024 年 04 月 22 日

附件：产品说明书

结核分枝杆菌利福平及异烟肼耐药突变检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）说明书

【产品名称】

通用名称：结核分枝杆菌利福平及异烟肼耐药突变检测试剂盒（荧光 PCR 熔解曲线法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测来自结核患者的结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本和培养物样本中的利福平和异烟肼耐药相关的基因突变。本产品通过检测结核分枝杆菌复合群 *rpoB* 基因 507~533 共 27 个氨基酸密码子区域内（81bp，利福平耐药决定区）的突变进行利福平耐药基因突变检测；通过检测 *ahpC* 启动子区（-44~-30 位点以及 -15-4）、*inhA* 启动子区（-17~-8 位点）以及 *katG315* 密码子的突变进行异烟肼耐药基因突变检测。本产品无法明确具体突变类型。

本产品可用于利福平和异烟肼耐药结核病的辅助诊断。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 熔解曲线法，其基本原理（见图 1、图 2）是：在 PCR 体系中加入两端分别标记有荧光基团与淬灭基团的探针，在 PCR 过程中扩增出与探针序列互补的单链寡核苷酸序列，在扩增完成后增加熔解曲线分析过程，同时实时监测荧光值的变化，通过计算荧光值与温度的负导数，可获得探针与该序列杂交产物的熔解曲线，并得出 T_m 值（熔点），从而推得该序列突变信息。如果靶序列与探针完全匹配，则探针与该序列杂交的 T_m 值最高；如果探针与序列不完全匹配，例如序列发生点突变、插入或者缺失，则探针与该序列杂交的 T_m 值低于探针与完全匹配序列杂交的 T_m 值。 T_m 值的降低程度与点突变类型、插入或缺失碱基数量以及突变位点的位置有关。

【主要组成成分】

组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	耐药 PCR 反应管 A	引物、探针、dNTPs、Taq 酶、UNG 酶	8 测试/条	6 条
	耐药 PCR 反应管 B	引物、探针、dNTPs、Taq 酶、UNG 酶	8 测试/条	6 条
对照试剂	耐药阳性对照	野生型靶基因质粒	12 测试/支	1 支
	耐药阴性对照	三羟甲基氨基甲烷 (Tris)、乙二胺四乙酸二钠 (EDTA·2Na)	12 测试/支	1 支
耗材	PCR 八联管管盖	透明 PCR 八联管管盖	8 测试/条	12 条

注：建议不同批号组分之间不互换。核酸提取试剂未包含在本试剂盒中。使用厦门致善生物科技股份有限公司的核酸提取试剂（备案号：闽厦械备 20170046）。

【储存条件及有效期】

本试剂盒于 -25~8℃ 避光保存，有效期为 18 个月。

拆封后未使用的反应管若未打开泡罩，应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 2~8℃ 避光保存且在 10 个月内用完，或于 -25~8℃ 避光保存且在 6 个月内用完；打开泡罩包装的剩余试剂应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 -25~8℃ 避光保存且在 5 个月内用完。可于 -18~37℃ 的温度范围内运输，运输时间不超过 10 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S / SLAN-96P；上海宏石医疗科技有限公司），最低适用 SLAN 全自动医用 PCR 分析系统软件版本：8.2.2.90103 版。

【样品要求】

来自结核患者的经分子生物学方法鉴定为结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本或经液体培养并经鉴定为结核分枝杆菌复合群阳性的液体培养物样本。

痰液样本置于 -20℃ 以下条件可保存 8 个月，置于 -70℃ 以下条件可保存 12 个月；培养物样本置于 -20℃ 以下条件可保存 8 个月，置于 -70℃ 以下条件可保存 24 个月。

1. 痰液样本

① 样品采集：采集患者的深咳痰，用无菌样本保存容器收集痰液，密闭送检。使用分子生物学方法鉴定为结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本，可用于结核分枝杆菌利福平及异烟肼耐药性检测。本产品临床试验采用的结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂为本公司的结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（实时荧光 PCR 法）（国械注准 20173403041）。

② 样本预处理：取 500μL 结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本，加入 1mL 痰处理液（痰处理液为核酸提取试剂组分，闽厦械备 20170046 号），振荡混匀，使痰液完全液化后离心弃上清液。加入 300 μL 裂解液 F5（裂解液 F5 为核酸提取试剂组分）重悬沉淀，并 99℃ 加热 10 min 后平衡至室温。（此步骤处理完成之后，若没有立即进行后续操作，请务必将处理完的样本放入 -18℃ 以下保存。）

2. 液体培养物

① 样品采集和预处理：采集患者身体相应部位的标本（如痰液、体液、组织等）进行预处理、净化和浓缩（使用 NALC-NaOH 方法进行处理）。

② 分离培养的方法

液体培养使用 BD BACTEC™ MGIT™ 960 全自动分枝杆菌培养监测仪进行。用 15 mL MGIT 营养添加剂复溶 MGIT 杂菌抑制剂冻干品，向 MGIT 7 mL 培养管中加入 0.8 mL MGIT 营养添加剂和杂菌抑制剂的混合溶液，加入 0.5 mL 预处理后样本菌悬液至 MGIT 7 mL 培养管中，盖上管盖并旋紧，放入全自动分枝杆菌培养监测仪中自动培养孵育。

一旦 MGIT 培养管通过仪器报告呈阳性，则应该准备涂片并进行抗酸染色。报告为液体培养阳性的培养物，采用基于免疫方法或采用 PNB 生长试验进行菌种鉴定，鉴定为结核分枝杆菌复合群阳性的培养物，可用于结核分枝杆菌利福平及异烟肼耐药性检测。

③ 液体培养物预处理：取结核分枝杆菌复合群阳性的液体培养物 1 mL，离心吸弃上清，加入 300 μL 裂解液 F5 重悬。将重悬后的细菌 99℃ 加热 10 min 后平衡至室温。（此步骤处理完成之后，若没有立即进行后续操作，请务必将处理完的样本放入 -18℃ 以下保存。）

【检验方法】

1: 试剂准备——配液区

① 首先从试剂盒中取出铝箔袋，撕开封口，打开自封条，然后打开耐药 PCR 反应管 A/B 的泡罩包装，分别取出 n 测试试剂（n 根据当次实验需要确定）。剩余试剂应放回铝箔自封袋并将封条封紧，于 8℃ 以下避光保存。

② 从试剂盒中取出 n 测试透明 PCR 八联管管盖（n 根据当次实验需要确定），剩余管盖应放回相应的自封袋并将封条封紧。

③ 将待用的耐药 PCR 反应管 A/B、透明 PCR 八联管管盖、耐药阳性对照和耐药阴性对照转移至提取间，于 8℃ 以下避光保存直至样本提取完。

2: 样品提取及加样——提取区

① 使用厦门致善生物科技股份有限公司的结核分枝杆菌核酸提取试剂（备案号：闽厦械备 20170046）进行提取。（提取的模板可保存于 -18℃ 以下，并于 6 个月内完成试验。模板若需长期保存，则置于 -70℃ 以下。注意不要反复冻融样品。）

② 打开原装的耐药 PCR 反应管管盖并丢弃，用微量加液器向每支 PCR

薄壁反应管中加入 25 μL 相应的提取样本或阴性/阳性对照品，之后立即盖严待用的透明 PCR 八联管管盖。

注：本试剂盒采用阳性对照和阴性对照进行质量控制，因此每次实验应设置阳性和阴性对照。耐药阳性/阴性对照在第一次使用前，需先离心 1 min，然后分别加入 600 μL 的处理后纯化水^a进行溶解，充分振荡混匀 20 s，瞬时离心。溶解后的阴性/阳性对照品于 -18 $^{\circ}\text{C}$ 以下贮存，反复冻融 ≤ 6 次。若需多次使用，可适量分装后备用。

③ 将已加入模板的 PCR 薄壁反应管于涡旋振荡器中充分振荡混匀 20 s，瞬时离心数秒，除去气泡。

④ 将离心后的 PCR 薄壁反应管转移至 PCR 扩增区。

注：^a可用去离子水代替

3: PCR 扩增及溶解曲线分析——扩增区

扩增与溶解曲线分析步骤为一个程序，在全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S / SLAN-96P; 上海宏石医疗科技有限公司) 上连续完成。

① 反应程序设定如下：

体系	本试剂盒反应体系设为 25 μL			
	阶段	条件	循环数	
PCR 反应程序	UNG 处理	50 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟	1	
	预变性	95 $^{\circ}\text{C}$ 10 分钟	1	
	Touchdown 循环程序	95 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒	71 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒 (每个循环下降 1 $^{\circ}\text{C}$)	10
		78 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒		
		95 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒		
	PCR 循环程序	61 $^{\circ}\text{C}$ 26 秒	78 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒	45
78 $^{\circ}\text{C}$ 15 秒				
95 $^{\circ}\text{C}$ 10 秒				
溶解分析程序	95 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟	40 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟 40 $^{\circ}\text{C}$ ~85 $^{\circ}\text{C}$ ，设置在此阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号，升温速率：0.04 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$	1	
	40 $^{\circ}\text{C}$ 2 分钟			
	40 $^{\circ}\text{C}$ ~85 $^{\circ}\text{C}$ ，设置在此阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号，升温速率：0.04 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$			
	40 $^{\circ}\text{C}$ ~85 $^{\circ}\text{C}$ ，设置在此阶段采集 FAM、HEX、ROX 和 Cy5 通道荧光信号，升温速率：0.04 $^{\circ}\text{C}/\text{s}$			

② 程序运行完毕，将 PCR 薄壁反应管（闭管）取出放入自封袋，将封口封严，按污染源处理。

【检验结果的解释】

1. 阳性对照的判读：A、B 两管共八个检测通道中均有对应熔解峰，且均符合表 1 参考值范围规定，则可判定为阳性质控合格，否则为阳性质控不合格，判定该次实验结果无效。

阳性对照在各通道中的 T_m 值范围如下：

表 1 阳性对照在 A、B 体系各通道中的 T_m 值范围

通道	T_m 值 ($^{\circ}\text{C}$)	
	反应体系 A	反应体系 B
FAM	72.3 ± 1.5	77.8 ± 1.5
HEX	72.9 ± 1.5	76.1 ± 1.5
ROX	78.0 ± 1.5	73.0 ± 1.5
Cy5	69.5 ± 1.5	73.1 ± 1.5

本说明书中各 T_m 值是在全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S / SLAN-96P; 上海宏石医疗科技有限公司) 上所得的常见值作为参考值。当次实验 T_m 值以仪器自动判读所得为准。

2. 阴性对照的判读：阴性对照加入的是不含模板的 DNA 溶解液，可质控样品在加样操作过程中是否发生了污染或空气中气溶胶的污染。若阴性对照任一通道出现熔解峰，则为阴性质控不合格，提示操作环境中可能有核酸污染，同步检测的样本可能出现假阳性的结果，判定该次实验结果无效。

3. 待检样本结果判读：

通过比较所检测样品与当次阳性对照之间熔解曲线 T_m 值的差异【 ΔT_m , $\Delta T_m = T_m$ (阳性对照) - T_m (待检样本)】判断样品是否发生突变。其中，A 管的 ROX、Cy5 通道和 B 管的 FAM、HEX 通道对应的是利福平检测通道（共四个通道）；A 管的 FAM、HEX 通道和 B 管的 ROX、Cy5 通道对应的是异烟肼检测通道（共四个通道）。因此，利福平和异烟肼的耐药情况可根据以上各自对应的四个通道独立进行判读。待检样品检验结果可由软件自动输出，也可人工判读。

表 2 利福平和异烟肼分别对应的耐药检测通道

检测项目	检测通道
利福平	A-ROX、A-Cy5、B-FAM、B-HEX
异烟肼	A-FAM、A-HEX、B-ROX、B-Cy5

当待检样品的 A-FAM、A-HEX、A-ROX、B-FAM、B-HEX、B-ROX 和 B-Cy5 通道中任一通道熔解峰出现 T_m 值高于阳性对照 1.5 $^{\circ}\text{C}$ 且不超过 2.0 $^{\circ}\text{C}$ ($-2.0^{\circ}\text{C} < \Delta T_m \leq -1.5^{\circ}\text{C}$) 或 A-Cy5 通道的熔解峰出现 T_m 值高于阳性对照 2.5 $^{\circ}\text{C}$ 及以上 ($\Delta T_m \leq -2.5^{\circ}\text{C}$) 时，则表明样本异常，结论为样本检测结果无效，请检查样本质量；建议重新提取后进行检测。

样本耐药情况的判读：

1) 利福平耐药的判读：

检验结果	判读结论
① 样本在利福平四个通道中均有熔解峰，且其 T_m 值与阳性对照的 T_m 值的差值 ΔT_m 在 -1.5 $^{\circ}\text{C}$ ~1.5 $^{\circ}\text{C}$ 之间 ($-1.5^{\circ}\text{C} < \Delta T_m < 1.5^{\circ}\text{C}$)；	利福平敏感
② 样本在利福平四个通道中均有熔解峰，且任一通道的 T_m 值低于阳性对照 1.5 $^{\circ}\text{C}$ 及以上 ($\Delta T_m \geq 1.5^{\circ}\text{C}$)；	利福平耐药
③ 样本在利福平四个通道中的任一通道无有效熔解峰；	利福平耐药性不明确（建议复检或用其他方法验证）
④ 若样本在 B-FAM 通道发生突变，可能导致 A-Cy5 通道出现熔解峰 T_m 值高于阳性对照 1.5 $^{\circ}\text{C}$ 但不超过 2.5 $^{\circ}\text{C}$ ($-2.5^{\circ}\text{C} < \Delta T_m \leq -1.5^{\circ}\text{C}$)，此时判读为利福平耐药；	特殊情况说明
⑤ <i>rpoB</i> 510-512 碱基缺失会导致 B-HEX 通道无熔解峰，当利福平四个通道中的其他三个通道均出现有效熔解峰时，则该情况判定为利福平耐药。	特殊情况说明

2) 异烟肼耐药的判读：

检验结果	判读结论
① 样本在异烟肼四个通道中均有熔解峰，且其 T_m 值与阳性对照的 T_m 值的差值 ΔT_m 在 -1.5 $^{\circ}\text{C}$ ~1.5 $^{\circ}\text{C}$ 之间 ($-1.5^{\circ}\text{C} < \Delta T_m < 1.5^{\circ}\text{C}$)；	异烟肼敏感
② 样本在异烟肼四个通道中均有熔解峰，且任一通道的 T_m 值低于阳性对照 1.5 $^{\circ}\text{C}$ 及以上 ($\Delta T_m \geq 1.5^{\circ}\text{C}$)；	异烟肼耐药
③ 样本在异烟肼四个通道中的任一通道无有效熔解峰；	异烟肼耐药性不明确（建议复检或用其他方法验证）
④ 若样本在异烟肼四个通道中的 A-FAM 通道无熔解峰，而其他三个通道均出现有效熔解峰，则 A-FAM 通道无熔解峰也可能是由于 <i>katG</i> 基因缺失导致。	特殊情况说明

将上述 1) 和 2) 的判读结果合并, 则为最终利福平和异烟肼的耐药性判读结果。

除上述利福平或异烟肼耐药判读中的特殊情况外, 无熔解峰情况的解释说明: 若对应利福平或异烟肼的四个检测通道出现一个或一个以上通道无熔解峰的情况, 说明该样品对于该耐药项目(利福平或异烟肼)的检测无有效信号。出现这种情况有几种可能的原因: ①样品中结核分枝杆菌含量低于本产品的最低检测限或样品中核酸降解; ②样品提取及加样实验操作失误。当以上情况出现时, 需要对相应样品进行重新提取复检或用其他方法验证。若阳性对照无熔解峰出现, 在试剂准备和加样操作均正确的情况下, 则表明试剂盒失效。

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、保存不当或加样不准确会引起试剂检测效能下降, 出现部分通道或八个通道均无熔解峰的情况, 导致无效结果。

【检验方法的局限性】

1. 由于本试验只筛选核酸序列而不是氨基酸序列, 因此, 有可能不引起氨基酸改变的突变(沉默突变)也会被判为突变型。
2. 如样品出现不均一耐药菌株, 需要结合熔解曲线峰型具体判断突变比例。
3. 本试验仅检测结核分枝杆菌由 *rpoB* 基因 81 bp 利福平耐药决定区、*ahpC* 启动子区(-44~-30 位点以及-15~-4)、*inhA* 启动子区(-17~-8 位点)以及 *katG315* 密码子引起的耐药, 由其他基因或基因区引起的突变以及其他耐药机制引起的耐药本试验不能检测。
4. 若不均一耐药株中耐药菌的比例偏低时(耐药菌占总菌含量的 30% 以下), 可能会导致熔解峰与阳性对照一致, 试验菌株判定为对利福平或异烟肼敏感, 造成假阴性结果。
5. 鉴于现有文献和研究资料无法证明, 被测对象中每个碱基的突变均能导致利福平或异烟肼耐药, 而方法学不能区分具体突变位点, 因此报告为突变的结果并不绝对表示耐药。
6. 由于检测靶基因的差异和试剂灵敏度的不同, 分子生物学方法鉴定为结核分枝杆菌阳性的痰样本, 本试剂盒存在检测结果无效的可能, 出现这种情况时需重新采集痰液样本提取核酸后检测, 或采用其他方法进行确定。

【产品性能指标】

1. 重复性: 检测重复性参考品, 结果为对应的野生型/突变型, 并且 T_m 值的变异系数 CV 值均不应高于 1%。
2. 特异性: 1) 交叉反应: 根据指导原则要求, 对临床痰液样本中可能存在试剂盒声称以外的其他分枝杆菌或其他病原体的相关情况进行验证。用于交叉反应的其他分枝杆菌共计 17 种(包括堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、土地分枝杆菌、次要分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、戈登分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、鸟分枝杆菌、瘰癧分枝杆菌、苏加分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、偶然分枝杆菌、胃分枝杆菌、胞内分枝杆菌、草分枝杆菌, 浓度均为 10^4 个菌/mL), 检测结果均为无效结果, 不产生交叉反应; 对出现在相应临床标本中可能产生交叉反应的常见病原体(包含肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌、隐球菌、金黄色葡萄球菌、诺卡氏菌、绿脓杆菌、白色念珠菌, 浓度均为 10^5 个菌/mL)进行验证, 检测结果均为无效结果, 不产生交叉反应。2) 干扰试验: 样本中常见的干扰物质如利福平(9 mg/L)、异烟肼(12 mg/L)、乙胺丁醇(8 mg/L)、阿莫西林(11 mg/L)、羧甲唑啉(1 mg/L)、莫匹罗星(20 mg/L)、吡嗪酰胺(45 mg/L)、扎那米韦(0.5 mg/L)、地塞米松(20 mg/L)等药物, 对检测结果均无影响。
3. 试剂盒最低检测限为: 10^3 个菌/mL。
4. 临床评价: 本产品已在 3 家机构完成了临床试验。采用申报产品与临床参考标准(药敏法)比较研究试验, 并同时采用一代测序对阳性样本

进行测序。针对痰液样本类型的利福平耐药基因突变检测, 申报产品与临床参考标准的临床灵敏度为 98.0%, 临床特异度为 95.9%, 总符合率为 96.4%。针对痰液样本类型的异烟肼耐药基因突变检测, 申报产品与临床参考标准的临床灵敏度为 92.2%, 临床特异度为 98.3%, 总符合率为 96.2%。针对培养物样本类型的利福平耐药基因突变检测, 申报产品与临床参考标准的临床灵敏度为 98.8%, 临床特异度为 98.2%, 总符合率为 98.5%。针对培养物样本类型的异烟肼耐药基因突变检测, 申报产品与临床参考标准的临床灵敏度为 93.7%, 临床特异度为 99.2%, 总符合率为 96.4%。此外, 通过一代测序对所有阳性样本进行了测序, 结果显示, 对于试验体外诊断试剂声称耐药基因区段的常见突变位点, 本次临床试验均有检出。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断, 操作人员必须经过培训且具有一定的经验, 试剂盒使用前请仔细阅读说明书。
2. 请严格按照基因扩增检验实验室的管理规范进行试验操作: 如 PCR 试验严格分区操作; 各区应有专用的手套、移液器等, 不得交叉使用, 避免污染; 工作人员应遵循从一区到二区的单方向工作原则, 各工作区相对隔离; 进行 PCR 试验的工作桌面及相关物品应定期用 1% 次氯酸钠、75% 酒精、1 M 盐酸或紫外灯进行灭菌和消毒。
3. 试验操作所需的消耗用品应一次性使用, 使用前进行无菌处理。
4. 冻存的阴性/阳性对照品溶液在使用前应充分融化, 并振荡混匀, 短暂离心。PCR 反应管加入模板后应充分振荡混匀并瞬时离心, 上机前应避免振摇, 应注意检查各反应管是否盖紧, 以免污染仪器。
5. PCR 反应管应避光保存, 每次试验应设置阴性和阳性对照。
6. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
7. 对照品尽量避免反复冻融, 应控制反复冻融 ≤ 6 次。如果需要多次使用, 请在第一次溶解后将阴/阳性对照分装冻存, 再根据需要取用。
8. 反应结束后, 需将 PCR 薄壁反应管(闭管)取出放入自封袋, 将封口封严, 按污染源处理。

【参考文献】

- [1] Ramasubban, G., Therese, K.L., Lakshmi, D., Sridhar, R., Meenakshi, N., Madhavan, H.N. Detection of novel and reported mutations in the *rpoB*, *katG* and *inhA* genes in multidrug-resistant tuberculosis isolates: A hospital-based study[J]. Journal of Global Antimicrobial Resistance, 2015, 3(1): 1.
- [2] Valvatne, H., Syre, H., Kross, M., Stavrum, R., Ti, T., Phyu, S., Grewal, H.M.S. Isoniazid and rifampicin resistance-associated mutations in *Mycobacterium tuberculosis* isolates from Yangon, Myanmar: implications for rapid molecular testing[J]. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 2009, 64(4): 694.
- [3] Luo, T., Zhao, M. Selection of mutations to detect multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* strains in Shanghai, China[J]. Antimicrobial Agents & Chemotherapy, 2010, 54(3): 1075.
- [4] Jena, L., Wankhade, G. Computational Approach in Understanding Mechanism of Action of Isoniazid and Drug Resistance[J]. 2016.
- [5] Spies, F.S., Von, G.A., Ribeiro, A.W., Ramos, D.F., Ribeiro, M.O., Dalla Costa, E.R., Martin, A., Palomino, J.C., Rossetti, M.L., Zaha, A. Biological cost in *Mycobacterium tuberculosis* with mutations in the *rpsL*, *rrs*, *rpoB*, and *katG* genes[J]. tuberculosis, 2013, 93(2): 150.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 厦门致善生物科技股份有限公司
住所: 厦门火炬高新区(翔安)产业区翔安北路 3701 号之 1 号楼
联系方式:

售后服务单位名称:

联系方式:

生产地址: 厦门火炬高新区(翔安)产业区翔安北路 3701 号之 1
号楼及 11 号楼 3 层 A 区、4 层

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】

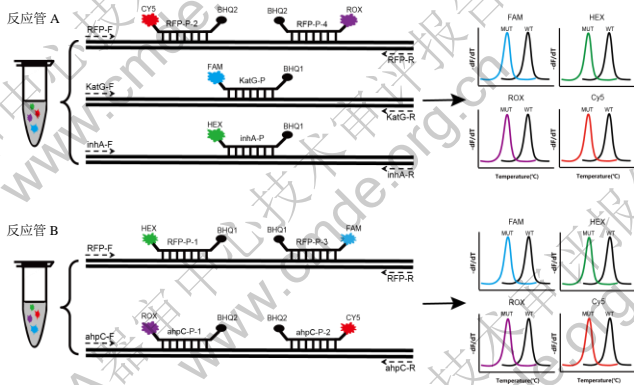


图 1 试剂盒检验原理

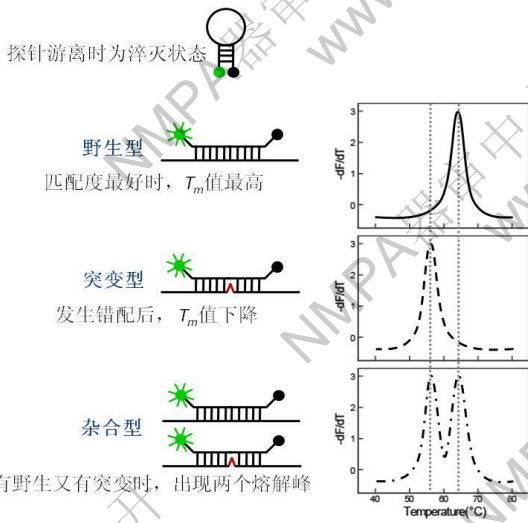


图 2 荧光 PCR 熔解曲线法基本原理