

受理号：CSZ2400102

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：结核分枝杆菌吡嗪酰胺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.....	5
三、 临床评价概述.....	9
四、 产品受益风险判定.....	11
综合评价意见.....	13

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)产业区莲亭路 884-2 号

三、生产地址

厦门火炬高新区(翔安)产业区莲亭路 884-1 号及 884-2 号

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

由扩增试剂和对照试剂组成。(具体详见说明书)

(二) 产品预期用途

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结核分枝杆菌的吡嗪酰胺耐药基因突变。本产品通过对结核分枝杆菌复合群 *pncA* 基因全基因共 187 个氨基酸密码子区域内 (561bp, 吡嗪酰胺耐药决定区) 和启动子区域-1 ~ -16 (16bp) 的突变进行吡嗪酰胺耐药基因突变检测。本产品无法明确具体突变类型。

本产品可用于吡嗪酰胺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倒数，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。同时在体系中 D 管对结核分枝杆菌 *gyrB* 基因进行检测，以辅助进行耐药判读。此外加入外源内标（拟南芥管家基因 SUC2 作为内标基因），对扩增体系进行质量控制。

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、聚合酶、UNG 酶、dNTPs、质粒等。主要原材料聚合酶和质粒为自产，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

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、最低检出量参

考品和重复性参考品。阳性参考品 34 支，由不同浓度和耐药突变类型的培养物和质粒 DNA 样本组成。阴性参考品 10 支，由不同类型的野生型培养物样本组成。最低检出量参考品 1 支。重复性参考品 7 支，由不同浓度和突变类型培养物样本组成。

还设置了阳性对照品和阴性对照品，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/或用量进行了优化，并对反应体系的扩增程序、变性时间、退火温度和时间、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，最终确定了最佳反应体系。

(三) 分析性能评估

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、核酸提取试剂性能等研究。

准确度研究中，申请人使用三批成品试剂盒，检测阴性（野生型）样本和阳性（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，申请人使用三批成品试剂盒，对不同浓度（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 5%，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 16 份临床菌株样本和 11 份制备痰液，以及 24 份 50%以上耐药比例的临床菌株样本和 11 份 50%以上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 10^2 CFU/mL，异质性检测能力为 50%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、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、烟曲霉、人流感病毒 A/B 型、人副流感病毒 I/II/III 型等) 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进行了评价。结果显示内源性血液 30% (v/v)、粘液 30% (v/v)、人细胞 ($1 \times 10^6/L$) 和外源性药物利福平、异烟肼、乙胺丁醇、阿莫西林、羟甲唑啉、莫匹罗星、吡嗪酰胺、扎那米韦、地塞米松及液体培养基等, 对本试剂检测不产生干扰。

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熔解峰 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及 T_m 差值确定野生型样本和突变型样本的阳性判断值。然后进一步采用 483 例野生型临床样本和 533 例突变型临床样本进行了阳性判断值的验证，结果显示确定的阳性判断值符合率良好。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、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其样本的有效保存时间。

实时稳定性：三批试剂盒分别储存于 $-20\pm 5^\circ\text{C}$ 和 -70°C 避光条件下，分别于不同时间点对试剂盒的外观、野生型/突变型参考品符合率、最低检测限、精密度、阳性/阴性对照等进行检测，确定试剂盒在 $-20\pm 5^\circ\text{C}$ 和 -70°C 以下避光条件下，可稳定保存 18 个月。

还对产品的冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的性能均能满足产品说明书的声称。

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

广东省公共卫生临床中心共 3 家临床检测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（药敏试验）进行比较研究，并同时与一代测序进行比较，确认本产品的临床性能。样本类型包括痰液和培养物。临床试验共包括两部分：

第一部分：试验体外诊断试剂与临床参考标准（药敏试验）的比较研究

针对痰液样本，共纳入 720 例样本，其中阳性 179 例，阴性 541 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 94.41%（95%CI：90.02%，96.94%），临床特异度为 98.34%（95%CI：96.87%，99.12%）。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，共纳入 877 例样本，其中阳性样本 253 例，阴性样本 624 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 93.28%（95%CI：89.50%，95.76%），临床特异度为 98.56%（95%CI：97.28%，99.24%）。以上结果显示两者检测结果之间具有良好的一致性。

第二部分：试验体外诊断试剂与一代测序的比较研究

针对痰液样本，共纳入 720 例样本，其中阳性 181 例，阴性 539 例。试验结果显示，试验体外诊断试剂与一代测序的临床灵敏度为 98.34%（95%CI：95.24%，99.44%），临床特异度为

100% (95%CI: 99.29%, 100%)。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，共纳入 877 例样本，其中阳性 249 例，阴性 628 例。试验结果显示，试验体外诊断试剂与一代测序的临床灵敏度为 98.39% (95%CI: 95.94%, 99.37%)，临床特异度为 100% (95%CI: 99.39%, 100%)。以上结果显示两者检测结果之间具有良好的一致性。

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。吡嗪酰胺药物是用于治疗结核病的一线抗结核药物，对结核分枝杆菌吡嗪酰胺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吡嗪酰胺耐药性检测，以辅助临床对吡嗪酰胺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吡嗪酰胺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结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本和培养物样本中结核分枝杆菌的吡嗪酰胺耐药基因突变。本产品通过对结核分枝杆菌复合群 *pncA* 基因全基因共 187 个氨基酸密码子区域内（561bp，吡嗪酰胺耐药决定区）和启动子区域-1~-16（16bp）的突变进行吡嗪酰胺耐药基因突变检测。本产品无法明确具体突变类型。

本产品可用于吡嗪酰胺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。

2025 年 9 月 2 日

附件：产品说明书

结核分枝杆菌吡嗪酰胺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：结核分枝杆菌吡嗪酰胺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病人的结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本和培养物样本中结核分枝杆菌的吡嗪酰胺耐药基因突变。本产品通过对结核分枝杆菌复合群 *pncA* 基因全基因共 187 个氨基酸密码子区域内（561bp，吡嗪酰胺耐药决定区）和启动子区域-1~16（16bp）的突变进行吡嗪酰胺耐药基因突变检测。本产品无法明确具体突变类型。

本产品可用于吡嗪酰胺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倒数，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。同时在体系中 D 管对结核分枝杆菌 *gyrB* 基因进行检测，以辅助进行耐药判读。此外加入外源内标（拟南芥管家基因 *SUC2* 作为内标基因），对扩增体系进行质量控制。

【主要组成成分】

试剂盒组成	组分名称	主要成分	规格	数量
扩增试剂	吡嗪酰胺 PCR Mix A	引物、探针、dNTPs	1060 μ L/管	1 管
	吡嗪酰胺 PCR Mix B	引物、探针、dNTPs	1060 μ L/管	1 管
	吡嗪酰胺 PCR Mix C	引物、探针、dNTPs	1060 μ L/管	1 管
	吡嗪酰胺 PCR Mix D	引物、探针、dNTPs、内标基因 <i>SUC2</i>	1060 μ L/管	1 管
	吡嗪酰胺酶混合液	Taq 酶、UNG 酶	90 μ L/管	1 管
对照试剂	吡嗪酰胺阳性对照	野生型质粒	500 μ L/管	1 管
	吡嗪酰胺阴性对照	不含靶基因的溶液（Tris、EDTA+2Na）	500 μ L/管	1 管

注：建议不同批号组分之间不互换。

需要但未提供的材料：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】

-18℃ 以下避光保存，有效期 18 个月。

试剂盒内各组分反复冻融建议不超过 4 次。建议采用 8℃ 以下温度运输。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

经验证可用的仪器为全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S；上海宏石医疗科技有限公司）。

【样品要求】

来自结核病人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 2~8℃ 条件下可保存 28 天，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；培养物样本置于 2~8℃ 条件下可保存 28 天，置于 -20℃ 以下条件可保存 8 个月，置于 -70℃ 以下条件可保存 36 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，密封送检。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吡嗪酰胺耐药性检测。

② 样本预处理：取 500 μ L 结核分枝杆菌复合群阳性的痰液样本，按照核酸提取试剂（备案号：闽厦械备 20170046）说明书操作进行样本处理。（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 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。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 生长试验等进行菌种鉴定，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吡嗪酰胺耐药性检测。

② 液体培养物预处理：取 1 mL 结核分枝杆菌复合群阳性的液体培养物样本，按照核酸提取试剂（备案号：闽厦械备 20170046）说明书操作进行样本处理。（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 首先将所有的试剂从冰箱取出并平衡至室温。PCR 反应液配液标准为：分别取 $n \times 19.6 \mu$ L 吡嗪酰胺 PCR Mix A 和 $n \times 0.4 \mu$ L 吡嗪酰胺酶混合液加入到 1.5 mL 离心管中；取 $n \times 19.6 \mu$ L 吡嗪酰胺 PCR Mix B 和 $n \times 0.4 \mu$ L 吡嗪酰胺酶混合液加入到另一 1.5 mL 离心管中；取 $n \times 19.6 \mu$ L 吡嗪酰胺 PCR Mix C 和 $n \times 0.4 \mu$ L 吡嗪酰胺酶混合液加入到另一 1.5 mL 离心管中；取 $n \times 19.6 \mu$ L 吡嗪酰胺 PCR Mix D 和 $n \times 0.4 \mu$ L 吡嗪酰胺酶混合液加入到另一 1.5 mL 离心管中。将离心管振荡混匀数秒，3000 g 离心数秒。配好的 PCR 反应液必须贮存在 4℃ 以下并在 4 小时内使用。

② PCR 反应液的分装：PCR 反应液 A/B/C/D 分别以每管 20 μ L 分装于 PCR 薄壁反应管。

③ 将配制好的 PCR 反应管装入自封袋转移至提取间。贮存在 4℃ 以下直至样品提取处理完毕。

2: 样品提取及加样——提取区

① 使用厦门致善生物科技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。反复冻融次数不超过5次。）

②用微量加液器向每支 PCR 薄壁反应管中加入相应的提取样品或吡嗪酰胺阴性/阳性对照 5 μL。立即盖严管盖。

③将已加入模板的 PCR 薄壁反应管瞬时离心数秒，除去气泡，并转移至 PCR 扩增区。

3: PCR 扩增——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; 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		
PCR 反应程序	阶段	条件	循环数
	UNG 处理	50℃ 2 分钟	1
	预变性	95℃ 10 分钟	1
	Touchdown 循环程序	95℃ 10 秒	10
		71℃ 15 秒(每个循环下降 1℃)	
		78℃ 15 秒	
	PCR 循环程序	95℃ 10 秒	55
61℃ 26 秒, 采集 FAM、HEX 两个通道荧光信号			
78℃ 15 秒			
熔解分析程序	95℃ 2 分钟	1	
	32℃ 2 分钟		
	32℃~80℃, 采集 FAM、HEX、ROX、Cy5 四个通道荧光信号, 升温速率 0.04℃/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。

【阳性判断值】

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) 判断样品是否发生了吡嗪酰胺耐药突变。

野生型峰判断值范围: $-1.6^\circ\text{C} < \Delta T_m < 1.6^\circ\text{C}$

突变型峰判断值范围: $|\Delta T_m| \geq 1.6^\circ\text{C}$

阳性对照在 A、B、C 体系及各通道中共 36 个熔解峰的 T_m 值范围如下表 1 所示:

表 1 阳性对照在 A、B、C 体系及各通道中的 36 个熔解峰的 T_m 值范围

体系	通道	T_m 值 (°C)		
		T_{m1}	T_{m2}	T_{m3}
A	FAM	46.1±1.6 (1)	58.5±1.6 (3)	69.2±1.6 (8)
	HEX	46.0±1.6 (14)	58.3±1.6 (17)	68.5±1.6 (34)
	ROX	52.7±1.6 (24)	61.8±1.6 (12)	67.8±1.6 (32)
	Cy5	50.2±1.6 (26)	61.6±1.6 (21)	70.6±1.6 (5)
B	FAM	53.3±1.6 (11)	60.5±1.6 (2)	67.7±1.6 (36)
	HEX	48.2±1.6 (27)	58.2±1.6 (33)	67.2±1.6 (31)
	ROX	55.0±1.6 (18)	63.2±1.6 (6)	70.8±1.6 (29)
	Cy5	51.0±1.6 (15)	60.7±1.6 (9)	68.6±1.6 (22)
C	FAM	45.7±1.6 (10)	58.9±1.6 (16)	68.9±1.6 (23)

HEX	50.1±1.6 (35)	62.4±1.6 (7)	73.3±1.6 (25)
ROX	45.6±1.6 (20)	59.3±1.6 (28)	65.5±1.6 (30)
Cy5	50.7±1.6 (13)	59.2±1.6 (4)	69.0±1.6 (19)

注: 括号内为对应熔解峰的序列号, 按其在基因上的排列顺序从 1~36。

阳性对照和阴性对照在反应体系 D 中均以 Ct 值 (扩增信号) 为判读依据, 其 Ct 值范围如表 2 所示:

表 2 阳性对照和阴性对照反应体系 D 的 Ct 值范围

类型	FAM 通道	HEX 通道
阳性对照	<18.5	<27.0
阴性对照	无信号	<27.0

本说明书中各 T_m 值是在全自动医用 PCR 分析系统 (SLAN-96S; 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。

【检验结果的解释】

检验结果可由软件自动输出, 也可人工判读, 判读结论与检验结果对照可见附表一。

1. 阳性对照的判读: A、B、C 三管共计十二个检测通道中均有对应熔解峰, D 管在 FAM 和 HEX 通道中均有扩增信号, 且以上均符合阳性对照 T_m 值和 Ct 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, 则判定该次实验结果无效。

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, 因反应体系 D 中加入外源内控, 可对反应体系进行质量控制, 同时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。若阴性对照除了 D-HEX 有扩增信号外, 其他任一通道出现熔解峰或 D-FAM 出现扩增信号, 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, 则判定该次实验结果无效。

3. 待检样本结果判读:

野生型峰: A、B、C 三管十二个通道中的 T_m 值与阳性对照的 T_m 值均一致 ($-1.6^\circ\text{C} < \Delta T_m < 1.6^\circ\text{C}$);

突变型峰: 不在野生型峰参考值范围内的即为突变型峰 ($|\Delta T_m| \geq 1.6^\circ\text{C}$)。当待检样本的 A、B、C 三管十二个通道中的 T_{m3} 出现 T_m 值大于等于阳性对照 1.6℃ 及以上时, 则表明样本异常, 结论为样本无效, 请检查样本质量; 建议重新提取后进行检测。

在此基础上, 样本耐药判读有如下情况:

(1) 不存在峰缺失情况 (熔解峰总数 ≥ 36 个)

①当 A、B、C 三管十二个通道中, 每个通道均存在 3 个野生型峰, 不存在突变型峰的情况下, 判定为野生型, 待检样品对吡嗪酰胺敏感。

②当 A、B、C 三管十二个通道中, 每个通道至少有 3 个熔解峰, 且其中存在一个及一个以上突变型峰时, 判定为突变型, 待检样品对吡嗪酰胺耐药;

(2) 存在峰缺失情况 (熔解峰总数 < 36 个)

①当 D-FAM 通道 Ct 值 < 25.2 且 D-HEX 通道 Ct 值 < 27.0 时, 若 A、B、C 三管十二个通道中存在 1 个或 2 个熔解峰缺失, 则可能为目标熔解峰存在突变, 刚好与临近野生型峰重合, 结论为待检样品对吡嗪酰胺耐药; 若 A、B、C 三管十二个通道中存在 3 个及以上熔解峰缺失, 且参考表 1 峰序列号

为连续缺失峰时，则可能目标序列存在短片段缺失，结论为待检样品对吡嗪酰胺耐药；若缺失峰不连续，结论为吡嗪酰胺耐药性不明确，建议重新提取后检测或采用其他方法验证。

②当 D-FAM 通道 Ct 值 ≥ 25.2 且 D-HEX 通道 Ct 值 < 27.0 时，若 A、B、C 三管十二个通道中存在熔解峰缺失，则表明样本浓度低，结论为吡嗪酰胺耐药性不明确，建议重新提取样本后检测。

③当 D-HEX 通道 Ct 值 ≥ 27.0 或无扩增信号时，若 A、B、C 三管十二个通道中任一通道出现熔解峰数 < 3 时，提示扩增发生了抑制，导致目的基因和内控均为阴性或无信号，结论为样本抑制，建议适当稀释后重检。

若被检测样品出现无熔解峰的情况，除了上述几种情况外，其他可能的原因：1、样品中不含结核分枝杆菌或结核分枝杆菌样品进行提取后加入反应体系的量低于本产品的检测灵敏度；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并再次检测。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、保存不当或试剂配制不准确会引起试剂检测效能下降，出现假阴性或检测不准确的结果。

【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）也会被判定为突变型。
2. 当 A、B、C 三管中 36 个熔解峰峰点与当次实验阳性对照均一致（误差不超过 1.6°C ），但某个通道熔解峰峰高显著低于阳性对照时，可能为吡嗪酰胺异质性耐药，建议采用其他方法进一步验证。
3. 本方法的特点是根据熔解曲线熔点的变化进行结果判读，由于非检测具体突变位点及异质性情况的复杂性，因此本体系对于异质性耐药不做判读。
4. 本试验仅检测结核分枝杆菌由 *pnca* 基因全基因共 187 个氨基酸密码子区域内（561 bp，吡嗪酰胺耐药决定区）和启动子区域-1~16（16 bp）的突变引起的耐药，由其他基因或基因区引起的突变以及其他吡嗪酰胺耐药机制引起的耐药本试验不能检测。
5. 鉴于现有文献和研究资料无法证明，被测区域中每个碱基的突变均能导致吡嗪酰胺耐药，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. 由于检测靶基因的变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 A、B、C 三管的 T_m 值的变异系数 CV 值均不应高于 2.0%，D 管 FAM、HEX 通道的 Ct 值的变异系数 CV 值均不应高于 5.0%。
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 10^7 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、铜绿假单胞菌、白色念珠菌、烟曲霉，浓度均为 10^7 个菌/mL；以及人流感病毒 A、B 型及人类副流感病毒 1、2、3 型，浓度均为 10^7 copies/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）、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）等药物及血液 30% (v/v)、粘液 30% (v/v)、人细胞（ 1×10^6 /L）、液体培养基 4% (v/v)，对检测结果均无影响。

3. 试剂盒最低检测限为： 10^2 CFU/mL；最低检出耐药比例为：50% (*pnca* 389T>G)。
4. 临床评价：本产品在三家临床单位共计检测并纳入统计了 877 例临床培养物样本和 720 例临床痰液样本。与药物敏感性试验检测结果对比，本产品检测临床培养物样本吡嗪酰胺耐药的临床灵敏度为 93.28%，特异度为 98.56%，总符合率为 97.04%；检测临床痰液样本吡嗪酰胺耐药的临床灵敏度为 94.41%，特异度为 98.34%，总符合率为 97.36%。与核酸序列测定结果对比，本产品检测临床培养物样本吡嗪酰胺耐药的临床灵敏度为 98.39%，特异度为 100%，总符合率为 99.54%；检测临床痰液样本吡嗪酰胺耐药的临床灵敏度为 98.34%，特异度为 100%，总符合率为 99.58%。

【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并具有一定的经验，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、1mol/L 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. 试剂盒中各试剂在使用前应充分融化，并振荡混匀，短暂离心。反应液分装时应尽量避免产生气泡。PCR 反应管加入模板后应瞬时离心，上机前应避免振荡，应注意检查各反应管是否盖紧，以免污染仪器。
5. PCR 反应液应避免光保存，每次试验应设置阴性对照和阳性对照。
6. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
7. 尽量避免反复冻融，应控制反复冻融次数 ≤ 4 次。如果需要多次使用，请在第一次融解后将制品分装冻存，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] Louw G E, Warren R M, Donald P R, et al. Frequency and implications of pyrazinamide resistance in managing previously treated tuberculosis patients [J]. Int J Tuerc Lung Dis, 2006, 10(7): 802-807.

[2] Sreevatsan S, Pan X, Zhang Y, et al. Mutations associated with pyrazinamide resistance in *pncA* of *Mycobacterium tuberculosis* complex organisms [J]. Antimicrob Agents Chemother, 1997, 41(3):636-640.

[3] Portugal I, Barreiro L, Moniz-Pereira J, et al. *pncA* mutations in pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* isolates in Portugal [J]. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 2004, 48(7):2736-2738.

【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）产业区莲亭路 884-2 号

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）产业区莲亭路 884-1 号及 884-2 号

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

附表一：判读结论与检验结果对应表

判读结论	检验结果
结果无效	①缺少阳性对照或阴性对照； ②阳性对照质控不合格； ③阴性对照质控不合格。
样本无效，请检查样本质量	A、B、C 三管十二个通道中的 T_m 出现 T_m 值大于等于阳性对照 1.6℃及以上。
吡嗪酰胺敏感	A、B、C 三管十二个通道中，每个通道均存在 3 个野生型峰，不存在突变型峰。
吡嗪酰胺耐药	A、B、C 三管十二个通道中，每个通道至少有 3 个熔解峰，且其中存在至少一个突变型峰。
	当 D-FAM 通道 Ct 值 < 25.2 且 D-HEX 通道 Ct 值 < 27.0 时，若 A、B、C 三管十二个通道中存在 1 个或 2 个熔解峰缺失，则可能为目标熔解峰存在突变，刚好与临近野生型峰重合。
吡嗪酰胺耐药性不明确，建议重新提取后检测或采用其他方法验证	当 D-FAM 通道 Ct 值 < 25.2 且 D-HEX 通道 Ct 值 < 27.0 时，若 A、B、C 三管十二个通道中存在 ≥ 3 个熔解峰缺失，且参考表 1 峰序列号为连续缺失峰时，则可能目标序列存在短片段缺失。
	当 D-FAM 通道 Ct 值 ≥ 25.2 且 D-HEX 通道 Ct 值 < 27.0 时，若 A、B、C 三管十二个通道中存在熔解峰缺失，则表明样本浓度低。
样本抑制，建议适当稀释后重检	当 D-HEX 通道 Ct 值 ≥ 27.0 或无扩增信号时，若 A、B、C 三管十二个通道中任一通道出现熔解峰数 < 3 时，提示扩增发生了抑制，导致目的基因和内控均为阴性或无信号。