

受理号：CSZ1900343

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 基因突变检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)

产品管理类别：第三类 6840

申请人名称：上海芯超生物科技有限公司

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	12
四、 产品受益风险判定	14
综合评价意见.....	17

基本信息

一、申请人名称

上海芯超生物科技有限公司

二、申请人住所

中国（上海）自由贸易试验区李冰路 151 号 5 号楼 4 楼

三、生产地址

中国（上海）自由贸易试验区李冰路 151 号 2 号楼 3 楼
（质检）、4 号楼 3 楼（生产）、5 号楼 3 楼（质检、研发）

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒包括核酸提取试剂和扩增反应试剂，由两个包装盒组成，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

类别	组分
核酸提取试剂	[蛋白酶]
	[磁珠]
	[裂解液]
	[洗涤液 A]
	[洗涤液 B]
扩增反应试剂	[洗脱液]
	[23S rRNA PCR 反应液 A]
	[23S rRNA PCR 反应液 B]
	[23S rRNA PCR 反应液 C]
	[23S rRNA PCR 反应液 D]
	[23S rRNA PCR 激活剂]
	[阴性对照]
[阳性对照]	

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测幽门螺杆菌感染患者胃黏膜组织样本中幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的

三种点突变 A2142G、A2143G 和 A2142C。

试剂盒用于幽门螺杆菌克拉霉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。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黏膜组织进行幽门螺杆菌耐药诊断的患者。

试剂盒未与具体药品进行相关临床试验，检测结果仅代表对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种点突变的检测结果。具体临床应用时，临床医生需结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是慢性活动性胃炎的直接病因，与消化性溃疡、黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤密切相关，是胃癌发生的危险因素。根除幽门螺杆菌是临床治疗慢性胃病的重要策略，不仅能加速消化性溃疡的愈合，而且能显著降低溃疡复发率，也可以减少早期胃癌术后的复发。目前，克拉霉素是临床上根除幽门螺杆菌治疗最常选用的抗生素之一，但随着克拉霉素等抗生素的广泛应用，幽门螺杆菌的耐药率逐年上升。目前已基本明确幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的机制是由于耐克拉霉素幽门螺杆菌的 23S rRNA 基因的 V 区发生点突变，导致核糖体构象改变，同时大环内酯类抗生素结合位点也随之发生改变，进而使幽门螺杆菌与大环内酯类药物亲和力减弱，导致药物不能阻止细菌的

蛋白合成，最终产生耐药。因此，应用 PCR 技术检测幽门螺杆菌 23S rRNA 基因突变得到一定认可，幽门螺杆菌对克拉霉素耐药研究也常以此为基础。

(三) 产品包装规格

24 人份/盒

(四) 产品检验原理

采用磁珠法从人胃黏膜组织样本中提取幽门螺杆菌核酸，利用荧光定量 PCR 技术对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种点突变进行定性检测。针对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因突变位点设计 ARMS 引物，各突变型的靶基因序列长度均在 100 bp 左右，内对照和外控的靶基因序列长度亦均在 100 bp 左右。每 4 个孔检测一个样本。1 个孔为外控，由 FAM 指示；另外 3 个孔分别检测三种点突变，突变情况由 FAM 指示；内对照由 JOE/VIC 指示；从而对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因三种点突变进行特异性检测。

采用尿嘧啶糖基化酶（UNG）作为防污染组分，降低核酸扩增产物污染的概率。

本试剂盒内对照采用人 β -球蛋白保守序列进行引物探针的设计，在样本中无需额外添加内对照，可整体监控样本的采集及检测过程，保证实验结果的准确性。

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：蛋白酶 K、引物、探针、HS Taq DNA 聚合酶、UNG 酶、dNTPs、质粒，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、精密度参考品以及提取效率参考品。企业参考品的主要原料为胃黏膜组织匀浆液、菌液等组成。阳性参考品 7 份，包括 A2143G 突变型阳性参考品、A2142G 突变型阳性参考品和 A2142C 突变型阳性参考品。阴性参考品 6 份，包括含野生型幽门螺杆菌的阴性参考品和含非幽门螺杆菌的其他胃肠道菌的阴性参考品。最低检测限参考品 18 份，包括 A2142G 突变型最低检测限参考品、A2143G 突变型最低检测限参考品和 A2142C 突变型最低检测限参考品。精密度参考品 4 份，包括 A2143G 突变型精密度参考品、A2142G 突变型精密度参考品、A2142C 突变型精密度参考品。提取效率参考品 1 份，为含一定浓度野生型幽门螺杆菌的参考品。以上企业参考品均含有一定浓度的人类基因组 DNA 作为内对照。

企业参考品所采用临床样本采用细菌培养和基因测序

的方法进行确认。企业参考品用于产品特异性、准确性、最低检出限、精密度检测。

(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。对试剂盒反应体系的研究中包含了核酸提取试剂和扩增反应试剂。其中核酸提取试剂的反应体系研究包括样本用量、裂解液用量、磁珠用量的优化等。扩增反应试剂的反应体系研究包括 DNA 聚合酶浓度、引物探针浓度、dNTPs 浓度、镁离子浓度、反应程序以及 PCR 反应体积优化等。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核酸提取纯化性能、准确度、精密度、分析灵敏度和分析特异性（交叉反应、干扰物质）等，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、Roche LightCycler 480 II 上进行的性能评估资料。

在核酸提取纯化性能评估中，申请人采用多例临床样本，针对手工和自动的核酸提取方式，分别评价了核酸的提取效率，提取后 DNA 的浓度和纯度，并进行了功能性实验，结果表明产品说明书中声称的不同提取方式均符合要求。

在准确度的性能评估中，使用阴性参考品和阳性参考品

进行检测，结果显示检测结果与预期结果阳性符合率与阴性符合率均为 100%。

在精密度的性能评估中，使用胃黏膜匀浆样本制备而成的 7 份精密度测试样本，分别包括 1 份一定浓度的野生型幽门螺杆菌、2 份不同浓度的 A2142G 突变型幽门螺杆菌、2 份不同浓度的 A2143G 突变型幽门螺杆菌和 2 份不同浓度的 A2142C 突变型幽门螺杆菌。使用三批次试剂盒在各适用机型上分别测试，具体方法为：20 天内每天做 2 个轮次的测试，每轮测试时，对同一样品作双份检测。结果显示，本试剂盒的批内、批间、日内、日间和总 CV 值均 $\leq 5\%$ 。

在分析灵敏度的性能评估中，进行了最低检测限的确定和验证。通过对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2142G、A2143G 和 A2142C 三种突变类型菌液在 100%和 10%两个突变比例下分别配制不同浓度梯度的最低检测限测试样本，每个浓度使用三批次试剂盒检测 20 次进行最低检测限的确定，结果显示：100%突变比例条件下，检测幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2142G、A2143G 和 A2142C 三种突变类型菌液 95%的阳性检出率水平的浓度均不高于 1.0×10^5 copies/mL；10%突变比例条件下，检测幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2142G、A2143G 和 A2142C 三种突变类型菌液 95%的阳性检出率水平的浓度均不高于 1.0×10^6 copies/mL。采用三批次试剂盒对最低检测限水平的 6 份菌液样本在各个适用机型上分别重复

检测 20 次进行最低检测限的验证，检测结果显示：在 100% 和 10% 两个突变比例条件下，检测各个最低检测限浓度幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2142G、A2143G 和 A2142C 三种突变类型菌液的阳性检出率均不低于 95%。申请人同时还研究了本产品检测限拷贝数与 CFU 的关系，对比本产品检测限与培养的检测限，结果显示产品较培养方法更为灵敏。

在交叉反应的性能评估中，使用三批次试剂盒在各个适用机型上检测含幽门螺杆菌 23S rRNA 基因非 A2142G/A2143G/A2142C 突变的其他突变的工程菌，耐克拉霉素金黄色葡萄球菌、耐克拉霉素肺炎链球菌、耐克拉霉素流感嗜血杆菌、耐克拉霉素鸟分枝杆菌、犬螺杆菌、鼠李糖乳杆菌、乙型溶血性链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、空肠弯曲杆菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、生孢梭菌、普通变形杆菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯氏菌、脆弱拟杆菌、鲍曼不动杆菌等，检测结果显示上述样本均为阴性。

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：血红蛋白（230 mg/mL）、白细胞（ 3×10^7 /mL）、胃蛋白酶（90.6 mg/mL）、胆红素（342 μ mol/L）、克拉霉素（2.75 μ g/mL）、阿莫西林（20.6 μ g/mL）、苯酰甲硝唑（2.875 μ g/mL）、左氧氟沙星（12 μ g/mL）、盐酸四环素（4 μ g/mL）、呋喃唑酮（0.33

$\mu\text{g/mL}$)、奥美拉唑 ($1.16\ \mu\text{g/mL}$)、雷贝拉唑钠 ($3.21\ \mu\text{g/mL}$)、埃索美拉唑镁 ($1.68\ \mu\text{g/mL}$)、兰索拉唑 ($4.15\ \mu\text{g/mL}$)、泮托拉唑钠 ($3.00\ \mu\text{g/mL}$)、枸橼酸铋钾 ($14\ \mu\text{g/mL}$)、乙酰水杨酸 ($300\ \mu\text{g/mL}$)、对乙酰氨基酚 ($55.38\ \mu\text{g/mL}$)、吲哚美辛 ($11.20\ \mu\text{g/mL}$)、布洛芬 ($704\ \mu\text{g/mL}$) 等在上述浓度时对本试剂的检测没有影响。

本次申报产品包括 1 种包装规格 (24 人份/盒), 2 种实时荧光定量 PCR 仪适用机型, 申请人提供了三批产品在适用机型上的性能评估资料。以上性能研究符合 44 号公告要求。

(四) 阳性判断值研究

申请人选择无幽门螺杆菌感染的样本、幽门螺杆菌感染且未发生 A2142G/A2143G/A2142C 突变的样本、幽门螺杆菌感染且存在 A2142G/A2143G/A2142C 不同突变的样本, 采用本试剂盒进行阳性判断值的研究, 对检测结果的 Ct 值及 Ct 值的差值进行 ROC 分析, 确定其阳性判断值为: 幽门螺杆菌外控反应孔 Ct 值 < 37 可判断该临床样本存在幽门螺杆菌感染; A2142G 突变检测反应孔 Ct 值与外控孔 Ct 值的差值 < 8 可判断该临床样本存在 A2142G 突变阳性; A2143G 突变检测反应孔 Ct 值与外控孔 Ct 值的差值 < 6 可判断该临床样本存在 A2143G 突变阳性; A2142C 突变检测反应孔 Ct 值与外控 Ct 值的差值 < 6 可判断该临床样本存在 A2142C 突变阳性。

确定阳性判断值后，申请人通过扩大临床样本检测量，采用培养方法和一代测序方法与本产品的检测结果进行比对，验证了本试剂盒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，将核酸提取试剂部分保存于 2~8℃ 条件下，扩增反应试剂部分避光密闭保存在 -20±5℃ 条件下，分别于保存第 0 月、第 6 月、第 9 月、第 12 月、第 13 月和第 14 月时取出试剂盒，对试剂盒的阴阳性对照、阴阳性符合率、最低检测限和精密度进行考察，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、南京市第一医院、上海市同济医院共 3 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

霉素体外药敏试验 (E-test) 进行比较研究, 共计入组 1095 例幽门螺杆菌感染受试者样本 (幽门螺杆菌培养阳性), 其中检出克拉霉素耐药菌株 426 例, 克拉霉素敏感菌株 669 例, 研究结果显示, 试验用体外诊断试剂临床灵敏度为 94.60% (95%CI: 92.01%~96.55%), 临床特异度为 87.89% (95%CI: 85.18%~90.27%)。

第二部分, 为进一步验证试验用体外诊断试剂针对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点、三种点突变的检测能力, 采用试验用体外诊断试剂与 Sanger 测序法进行对比试验。共计入组幽门螺杆菌感染患者 1144 例, 其中测序检出突变阳性样本 498 例, 突变阴性样本 646 例, 两种方法阳性符合率为 100% (95%CI: 99.26%~100%), 阴性符合率为 97.68% (95%CI: 96.20%~98.69%), 总符合率为 98.69% (95%CI: 97.85%~99.26%)。针对具体的突变位点, 对比试验结果显示: A2143G 位点测序检出突变阳性 456 例, 突变阴性 688 例, 两种检测方法阳性符合率为 100% (95%CI: 99.19%~100%), 阴性符合率为 97.97% (95%CI: 96.61%~98.88%), 总符合率 98.78% (95%CI: 97.96%~99.33%); A2142G 位点测序检出突变阳性 37 例, 突变阴性 1107 例, 两种检测方法阳性符合率为 100% (95%CI: 90.51%~100%), 阴性符合率为 99.46% (95%CI: 98.82%~99.80%), 总符合率 99.48% (95%CI: 98.86%~99.81%); A2142C 位点测序

检出突变阳性 23 例，突变阴性 1121 例，两种检测方法阳性符合率为 100% (95%CI: 85.18%~100%)，阴性符合率为 100% (95%CI: 99.67%~100%)，总符合率 100% (95%CI: 99.68%~100%)。针对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因 A2142G 突变、A2143G 突变与 A2142C 突变，考核试剂检测结果与 Sanger 测序结果一致性良好。

综上，临床试验结果显示，本产品检测结果用于幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的辅助判断，灵敏度、特异度良好，满足临床需求；针对幽门螺杆菌 23S rRNA A2143G、A2142G、A2142C 基因突变的检测与 Sanger 测序法一致性良好。

四、产品受益风险判定

(一) 受益评估

幽门螺杆菌 (*Helicobacter pylori*, Hp) 是慢性活动性胃炎的直接病因，与消化性溃疡、MALT 淋巴瘤密切相关，是胃癌发生的最重要致癌因素。根除幽门螺杆菌是临床防治消化性溃疡、幽门螺杆菌相关消化不良等慢性胃病，防止胃炎向胃癌进展的重要手段。目前，克拉霉素是临床上根除幽门螺杆菌治疗最常选用的抗生素之一，但随着克拉霉素等抗生素的广泛应用，幽门螺杆菌的耐药率逐年上升。

现阶段，体外培养菌株的药敏试验是临床上可以使用的幽门螺杆菌抗生素耐药评价的主要方法，但幽门螺杆菌培养灵敏度偏低，特别是当感染菌株包含敏感株和耐药株时，可

能因为耐药株不是优势菌株而造成漏检，且该方法有一定的技术要求，操作过程较为复杂，时间较长。

《第五次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》中明确，随着分子生物学技术的发展，采用分子生物学方法检测幽门螺杆菌耐药基因突变对于幽门螺杆菌耐药的评价具有临床实用价值。

本试剂通过检测幽门螺杆菌感染患者胃黏膜组织样本中幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种点突变 A2142G、A2143G 和 A2142C，用于幽门螺杆菌克拉霉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。临床应用主要受益在于：对于幽门螺杆菌感染者中，需要进行克拉霉素药物敏感性评价的，提供除培养细菌药敏试验外的另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。检测阳性（突变）患者可避免使用克拉霉素治疗导致的治疗失败，从而提高幽门螺杆菌根除率。经临床试验评价，该产品对于感染幽门螺杆菌克拉霉素耐药菌株的患者，检测灵敏度为 94.6%。

（二）风险评估

该产品主要风险来自于检测存在假阴性的情形，如果对于幽门螺杆菌克拉霉素耐药菌株感染者本检测结果为阴性，则可能导致患者接受克拉霉素相关治疗，从而导致治疗失败。经临床试验研究，本检测假阴性的概率是 5.4%。

（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：

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黏膜组织进行幽门螺杆菌耐药诊断的患者。检测结果仅代表对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种点突变的检测结果。具体临床应用时，临床医生需结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

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，属于创新审批项目（编号：201800016）。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。

2021 年 03 月 25 日

附件：产品说明书



幽门螺杆菌 23S rRNA 基因突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：幽门螺杆菌 23S rRNA 基因突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】 24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测幽门螺杆菌感染患者胃黏膜组织样本中幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种点突变 A2142G、A2143G^[1]和 A2142C。

试剂盒用于幽门螺杆菌克拉霉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。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黏膜组织进行幽门螺杆菌耐药诊断的患者。

试剂盒未与具体药品进行相关临床试验，检测结果仅代表对幽门螺杆菌 23S rRNA 基因两个多态性位点的三种点突变的检测结果。具体临床应用时，临床医生需结合病例的实际情况进行判断，不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

幽门螺杆菌(*Helicobacter pylori*, Hp)是慢性活动性胃炎的直接病因，与消化性溃疡、黏膜相关性淋巴样组织淋巴瘤密切相关，是胃癌发生的危险因素。根除幽门螺杆菌是临床治疗慢性胃病的重要策略，不仅能加速消化性溃疡的愈合，而且能显著降低溃疡复发率，也可以减少早期胃癌术后的复发^[2]。目前，克拉霉素是临床上根除幽门螺杆菌治疗最常选用的抗生素之一，但随着克拉霉素等抗生素的广泛应用，幽门螺杆菌的耐药率逐年上升。目前已基本明确幽门螺杆菌对克拉霉素耐药的机制是由于耐克拉霉素幽门螺杆菌的 23S rRNA 基因的 V 区发生点突变，导致核糖体构象改变，同时大环内酯类抗生素结合位点也随之发生改变，进而使幽门螺杆菌与大环内酯类药物亲和力减弱，导致药物不能阻止细菌的蛋白合成，最终产生耐药^[3]。因此，应用 PCR 技术检测幽门螺杆菌 23S rRNA 基因突变得到一定认可，幽门螺杆菌对克拉霉素耐药研究也常以此为基础^[4-6]。

【检验原理】

1. 采用磁珠法从人胃黏膜组织样本中提取幽门螺杆菌核酸，利用荧光定量PCR技术对幽门螺杆菌23S rRNA基因两个多态性位点的三种点突变进行定性检测。针对幽门螺杆菌23S rRNA基因突变位点设计ARMS引物，各突变型的靶基因序列长度均在100 bp左右，内对照和外控的靶基因序列长度亦均在100 bp左右。每4个孔检测一个样本。1个孔为外控，由FAM指示；另外3个孔分别检测三种点突变，突变情况由FAM指示；内对照由JOE/VIC指示；从而对幽门螺杆菌23S rRNA基因三种点突变进行特异性检测。

2. 采用尿嘧啶糖基化酶（UNG）作为防污染组分，降低核酸扩增产物污染的概率。

3. 本试剂盒内对照采用人β-球蛋白保守序列进行引物探针的设计，在样本中无需额外添加内对照，可整体监控样本的采集及检测过程，保证实验结果的准确性。

【主要组成成分】

本试剂盒包括核酸提取试剂和扩增反应试剂，由以下两个包装盒组成：

类别	组分	包装规格	每人份中用量	主要成分
核酸提取试剂	[蛋白酶]	530 μL×1支	20 μL	蛋白酶K、三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸、氯化钙，醋酸钙
	[磁珠]	270 μL×1支	10 μL	磁珠混悬液
	[裂解液]	8 mL×1瓶	300 μL	柠檬酸、柠檬酸三钠、硫氰酸胍、多聚腺苷酸
	[洗涤液A]	9.5 mL×1瓶	500 μL	三羟甲基氨基甲烷、硫氰酸胍
	[洗涤液B]	5.5 mL×1瓶	1000 μL	三羟甲基氨基甲烷、氯化钠
	[洗脱液]	2.7 mL×1瓶	100 μL	三羟甲基氨基甲烷、乙二胺四乙酸
扩增反应试剂	[23S rRNA PCR反应液A]	375 μL×1支	15 μL	Taq酶、脱氧核糖核苷三磷酸、23S 探针、23S A管左引物、23S 右引物、Hp-IC探针、Hp-IC左引物、Hp-IC右引物
	[23S rRNA PCR反应液B]	375 μL×1支	15 μL	Taq酶、脱氧核糖核苷三磷酸、23S 探针、23S B管左引物、23S 右引物、Hp-IC探针、Hp-IC左引物、Hp-IC右引物
	[23S rRNA PCR反应液C]	375 μL×1支	15 μL	Taq酶、脱氧核糖核苷三磷酸、23S 探针、23S C管左引物、23S 右引物、Hp-IC探针、Hp-IC左引物、Hp-IC右引物
	[23S rRNA PCR反应液D]	375 μL×1支	15 μL	Taq酶、脱氧核糖核苷三磷酸、23S 探针、23S D管左引物、23S 右引物、Hp-IC探针、Hp-IC左引物、Hp-IC右引物
	[23S rRNA PCR激活剂]	500 μL×1支	20 μL	镁离子
	[阴性对照]	250 μL×1支	/	含内对照质粒
	[阳性对照]	250 μL×1支	/	含各突变质粒和内对照质粒

备注：不同批号产品的组分不可以互换或混用。

需要但未提供：

- 1、研钵及研磨杵（天根高速组织研磨套装 OSE-Y30 及金属研磨杵 OSE-Y002 或第三代塑料研磨杵 OSE-Y001）
- 2、无菌生理盐水（预冷）
- 3、无水乙醇（AR）
- 4、移液器吸头（必须选用含 DNase-Free 和 RNase-Free 的滤芯）
- 5、PCR 扩增 96 孔板或 8 连管

注：洗涤液 A、B 使用前分别加入 4mL、22mL 无水乙醇。

【储存条件及有效期】

试剂盒核酸提取试剂部分 2~8℃ 储存，扩增反应试剂部分避光密闭保存于 -20±5℃，有效期为 12 个月。

开瓶稳定性：在 2~8℃ 可稳定 5 天。

冻融稳定性：最大允许反复冻融（-20±5℃/室温复融）的次数为 5 次。

生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

核酸提取仪：天隆 NP968-C、奇法 PF32A

实时荧光定量 PCR 仪：ABI7500 荧光 PCR 仪、Roche LightCycler 480 II

【样本要求】

1. 新鲜或者冷冻保存的胃黏膜组织样本。
2. 样本采集：取胃黏膜组织样本，置无菌冻存管内，密封送检。采样时应首选病灶部位。
3. 样本保存：所采集的新鲜样本可立即测试或存储待测（存储时，胃黏膜组织样本置于无菌冻存管内，盖紧管盖，做好样本编号、取样部位等标记，2~8℃ 不超过 24 小时，-20±5℃ 不超过 3 个月，-70℃ 及以下不超过 24 个月）。冷冻样本不建议反复冻融，冻融次数在 5 次以内。
4. 样本提取后，核酸提取产物的浓度范围需在 10-130 ng/μL，纯度范围需在 1.6-2.1 之间。

【检验方法】

所有操作需采用无 DNA 酶的带滤芯吸嘴及离心管，在样本处理区进行。取出两个包装盒中的各个组分平衡至室温（注：温度较低时裂解液中可能会有沉淀析出，平衡至室温沉淀溶解后使用，磁珠在加入前震荡混匀）。

1. 样本预处理：
 - 1.1 将 1 块胃黏膜组织样本置于一无菌的 1.5 mL 离心管中。
 - 1.2 加入 150μL 预冷生理盐水，采用研磨器及一次性研磨杵研磨成匀浆液（一例样本使用一个研磨杵，研磨杵一次性使用，使用后作医疗废物处理；研磨器使用后外部用 75% 酒精擦拭清洁。）
 - 1.3 往匀浆液中加入 20μL 蛋白酶，充分混匀后于 65℃ 孵育 15-30min，瞬时离心后吸取 100μL 上清备用。
2. 自动核酸提取（可选）
 - 2.1 在 96 深孔板第 1 列/第 7 列加入 10μL 磁珠和 300μL 裂解液，第 2 列/第 8 列加入 500μL 洗涤液 A，第 3 列/第 9 列和第 4 列/第 10 列加入 500μL 洗涤液 B，第 6 列/第 12 列加入 100μL 洗脱液；
 - 2.2 在加有裂解液的孔中分别加入 100μL 待测样本上清液、阳性对照、阴性对照；
 - 2.3 按照下表设定并运行核酸提取程序。

编号	孔位	名称	等待时间(min)	混合时间(min)	磁吸时间(sec)	混合速率	容积(μL)	温度状态	温度(℃)
1	1	Lysis	0	10	60	慢	410	关闭	0
2	2	Wash A	0	2	60	中	500	关闭	0
3	3	Wash B	0	2	60	中	500	关闭	0
4	4	Wash B	0	2	60	中	500	关闭	0
5	6	Elution	10	5	90	中	100	加温	60
6	4	Move	0	2	0	慢	500	关闭	0

- 2.4 运行完成后，将 96 深孔板取出，其余耗材废弃，置垃圾袋包扎后统一处理。
- 2.5 将 96 深孔板置于磁板上，室温静置 1 分钟后将溶液缓慢小心地转移到新的离心管（注意不要碰到孔底的磁珠），用于后续 PCR 检测。
3. 手工提取核酸（可选）
 - 3.1 取 (N+2) 个离心管（N 为待提取样本数量；2 为阴性对照和阳性对照，与样本一起参与提取），作好标记后分别加入 10μL 磁珠。
 - 3.2 加入 100μL 预处理后的上清，用带滤芯吸嘴反复吹打 2-3 次。
 - 3.3 加入 300μL 裂解液，盖上管盖，振荡混匀，室温静置 10 分钟。
 - 3.4 瞬时离心去除管盖上的液滴，将离心管置于磁分离架上，磁吸附 1 分钟后将废液吸除（注意不要碰到吸附于管壁上的磁珠）。

- 3.5 加入500 μ L洗涤液A, 振荡混匀, 将离心管置于磁分离架上, 磁吸附1分钟后将废液吸除。
- 3.6 加入500 μ L洗涤液B, 振荡混匀, 将离心管置于磁分离架上, 磁吸附1分钟后将废液吸除。
- 3.7 重复3.6, 磁吸附后将废液完全吸除, 室温开盖干燥10-20分钟至管内无液体残留。
- 3.8 加入100 μ L洗脱液, 振荡混匀, 60 $^{\circ}$ C 孵育5分钟。
- 3.9 将离心管置于磁分离架上, 磁吸附1分钟后将溶液转移到新的离心管(注意不要碰到管底的磁珠), 用于后续PCR检测。

4. PCR试剂准备(在PCR前准备区进行)

将23S rRNA PCR反应液A、23S rRNA PCR反应液B、23S rRNA PCR反应液C、23S rRNA PCR反应液D和23S rRNA PCR激活剂混匀离心后按照下表格进行配制:

孔号	孔位名称	组份	加量(μ L/test)	加量(μ L)
A	幽门螺杆菌外控反应孔	23S rRNA PCR反应液A	15	15*(n+2)
		23S rRNA PCR激活剂	5	5*(n+2)
B	A2142G突变检测反应孔	23S rRNA PCR反应液B	15	15*(n+2)
		23S rRNA PCR激活剂	5	5*(n+2)
C	A2143G突变检测反应孔	23S rRNA PCR反应液C	15	15*(n+2)
		23S rRNA PCR激活剂	5	5*(n+2)
D	A2142C突变检测反应孔	23S rRNA PCR反应液D	15	15*(n+2)
		23S rRNA PCR激活剂	5	5*(n+2)

注: n为待测样本数

配制完成后, 将各反应液分装到PCR反应管/板中(每4孔为一组, 分别加入配好的A、B、C、D反应液, 检测一个样本)。

5. 加样(在样本处理区进行)

在装有PCR反应液的反应管中用带滤芯吸嘴分别加入5 μ L核酸模板, 盖上管盖, 混匀、离心后, 转移到扩增检测区。

6. PCR扩增检测(在扩增检测区进行)

- 6.1 将反应管放入荧光PCR仪进行扩增检测。
- 6.2 循环参数设定:

步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50 $^{\circ}$ C	2 分钟
2	预变性	95 $^{\circ}$ C	10 分钟
3	扩增、检测	95 $^{\circ}$ C	10 秒
		60 $^{\circ}$ C	40 秒

步骤3中60 $^{\circ}$ C时荧光检测通道: FAM(幽门螺杆菌23S rRNA基因荧光信号)、JOE/VIC(内对照荧光信号)

6.3 结果获取

根据仪器软件进行分析, 得到各样本的检测结果。(基线优先考虑仪器自动选择, 若使用手动选择, 建议选取3~15, 或根据样本检测的具体情况设置基线, 阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方)

6.4 质量控制

阴性对照: 四个孔位的测定结果 FAM 通道均为阴性(无明显信号, 或有信号但 A 孔 $37 \leq Ct \leq 40$), JOE/VIC 通道均为阳性 ($24 < Ct \leq 34$)。

阳性对照: 四个孔位的测定结果 FAM 通道均为阳性 (A 孔 $22 < Ct \leq 31$, B 孔 $\Delta Ct \leq 8$, C 孔 $\Delta Ct \leq 6$, D 孔 $\Delta Ct \leq 6$), JOE/VIC 通道均为阳性 ($24 < Ct \leq 34$)。

【阳性判断值或者参考区间】

通过临床实验分析, 利用ROC曲线确定本试剂盒幽门螺杆菌外控反应孔Ct值的cut-off值为37, Ct值 < 37 判断幽门螺杆菌感染; A2142G突变检测反应孔与外控Ct值差值(即B-A的 ΔCt 值)的cut-off值为8, ΔCt 值 < 8 判断A2142G突变阳性; A2143G突变检测反应孔与外控Ct值差值(即C-A的 ΔCt 值)的cut-off值为6, ΔCt 值 < 6 判断A2143G突变阳性; A2142C突变检测反应孔与外控Ct值差值(即D-A的 ΔCt 值)的cut-off值为6, ΔCt 值 < 6 判断A2142C突变阳性。

【检验结果的解释】

- 阴性对照的四个孔位的FAM通道应无明显信号, 或有信号但A孔 $37 \leq Ct \leq 40$, JOE/VIC通道应有明显信号且 $24 < Ct \leq 34$, 否则该次实验视为无效。阳性对照的四个孔位的FAM通道应有明显信号且A孔 $22 < Ct \leq 31$, B孔 $\Delta Ct \leq 8$, C孔 $\Delta Ct \leq 6$, D孔 $\Delta Ct \leq 6$, JOE/VIC通道均为阳性 ($24 < Ct \leq 34$), 否则该次实验视为无效。
- 待测样本的JOE/VIC通道应有信号且Ct值 < 38 , 若无信号或 $38 \leq Ct \leq 40$, 则建议重新提取DNA或重新取样。待测样本外控反应孔的FAM通道若无明显信号或 $37 \leq Ct \leq 40$, 说明该样本无幽门螺杆菌感染; 若FAM通道有明显信号且Ct值 < 37 , 说明该样本存在幽门螺杆菌感染, 则进行后续突变结果的判断。
- 突变结果的判断: 确定待测样本三个突变检测反应孔(A2142G突变检测反应孔、A2143G突变检测反应孔和A2142C突变检测反应孔)的FAM通道Ct值(Ct值 < 40)与外控反应孔的FAM通道Ct值, 计算 ΔCt ($\Delta Ct = \text{突变检测反应孔Ct值} - \text{外控反应孔Ct值}$)。通过比较 ΔCt 与cut-off ΔCt 值之间的关系来判读结果, 如下表所示进行判断。

反应孔	A2142G突变检测反应孔	A2143G突变检测反应孔	A2142C突变检测反应孔
突变型	A2142G	A2143G	A2142C
cut-off ΔCt	8	6	6
阴性	FAM通道无信号或Ct值=40		
	$\Delta Ct \geq \text{cut-off } \Delta Ct$		

阳性	$\Delta Ct < \text{cut-off} - \Delta Ct$
----	--

若该突变检测反应孔的FAM通道无信号或Ct值=40, 则判断为阴性, 即无该类型突变。若该突变检测反应孔的FAM通道Ct值 ≤ 40 , 则判断 ΔCt : ΔCt 大于等于cut-off ΔCt 时, 则判断为阴性, 即无该类型突变; ΔCt 小于cut-off ΔCt 时, 则判断为阳性, 即存在该类型突变。

4. 可能出现的实验结果: (1) 无幽门螺杆菌感染; (2) 存在幽门螺杆菌感染且无突变; (3) 存在幽门螺杆菌感染且为A2142G突变; (4) 存在幽门螺杆菌感染且为A2143G突变; (5) 存在幽门螺杆菌感染且为A2142C突变; (6) 存在幽门螺杆菌感染且存在A2142G突变、A2143G突变; (7) 存在幽门螺杆菌感染且存在A2142G突变、A2142C突变; (8) 存在幽门螺杆菌感染且存在A2143G突变、A2142C突变; (9) 存在幽门螺杆菌感染且存在A2142G突变、A2143G突变、A2142C突变。

【检验方法的局限性】

1. 试剂盒的检测结果仅供临床参考, 对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 若样本采集、运输、储存及处理过程不合理, 检测结果可能出现偏差或错误。
3. 使用本试剂盒进行检测, 仅限于本说明书中提及的样本类型及适用机型。

【产品性能指标】

1. 阴性符合率:

检测企业阴性参考品N1~N6, N1~N4为无幽门螺杆菌感染, N5、N6为存在幽门螺杆菌感染且无突变, 符合率(-/-)为6/6。

2. 阳性符合率:

检测企业阳性参考品P1~P7, P1~P3、P7为存在幽门螺杆菌感染且为A2143G突变, P4~P5为存在幽门螺杆菌感染且为A2142G突变, P6为存在幽门螺杆菌感染且为A2142C突变, 符合率(+/-)为7/7。

3. 最低检测限:

检测企业最低检测限参考品L1~L18, 其中:

L1、L2、L4、L5为存在幽门螺杆菌感染且为A2142G突变, L3和L6不作要求;

L7、L8、L10、L11为存在幽门螺杆菌感染且为A2143G突变, L9和L12不作要求;

L13、L14、L16、L17为存在幽门螺杆菌感染且为A2142C突变, L15和L18不作要求。

100%突变比例条件下, 检测幽门螺杆菌23S rRNA基因A2142G、A2143G和A2142C三种突变类型菌液95%的阳性检出率水平的浓度均不高于 1.0×10^5 copies/mL;

10%突变比例条件下, 检测幽门螺杆菌23S rRNA基因A2142G、A2143G和A2142C三种突变类型菌液95%的阳性检出率水平的浓度均不高于 1.0×10^6 copies/mL。

4. 精密度:

检测企业精密度参考品J1、J2、J3、J4, 各重复10次。

J1、J3均为存在幽门螺杆菌感染且为A2143G突变, J2为存在幽门螺杆菌感染且为A2142G突变, J4为存在幽门螺杆菌感染且为A2142C突变。

J1外控孔Ct值与A2143G突变孔Ct值分别计算CV, 且 $CV \leq 5\%$ (n=10);

J2外控孔Ct值与A2142G突变孔Ct值分别计算CV, 且 $CV \leq 5\%$ (n=10);

J3外控孔Ct值与A2143G突变孔Ct值分别计算CV, 且 $CV \leq 5\%$ (n=10);

J4外控孔Ct值与A2142C突变孔Ct值分别计算CV, 且 $CV \leq 5\%$ (n=10)。

5. 提取效率:

检测提取效率参考品T1, 检出为存在幽门螺杆菌感染且为无突变。

6. 分析特异性

6.1 交叉反应: 试剂盒对耐克拉霉素金黄色葡萄球菌、耐克拉霉素肺炎链球菌、耐克拉霉素流感嗜血杆菌、耐克拉霉素鸟分枝杆菌、犬螺杆菌、鼠李糖乳杆菌、乙型溶血性链球菌、大肠杆菌、沙门氏菌、空肠弯曲菌、铜绿假单胞菌、金黄色葡萄球菌、枯草芽孢杆菌、黑曲霉菌、白色念珠菌、生孢梭菌、普通变形杆菌、粪肠球菌、肺炎克雷伯氏菌、脆弱拟杆菌、鲍曼不动杆菌等均无特异性扩增。

6.2 干扰物质: 血红蛋白 (230 mg/mL)、白细胞 (3×10^7 /mL)、胃蛋白酶 (90.6 mg/mL)、胆红素 (342 $\mu\text{mol/L}$)、克拉霉素 (2.75 $\mu\text{g/mL}$)、阿莫西林 (20.6 $\mu\text{g/mL}$)、苯酰甲硝唑 (2.875 $\mu\text{g/mL}$)、左氧氟沙星 (12 $\mu\text{g/mL}$)、盐酸四环素 (4 $\mu\text{g/mL}$)、呋喃唑酮 (0.33 $\mu\text{g/mL}$)、奥美拉唑 (1.16 $\mu\text{g/mL}$)、雷贝拉唑钠 (3.21 $\mu\text{g/mL}$)、埃索美拉唑镁 (1.68 $\mu\text{g/mL}$)、兰索拉唑 (4.15 $\mu\text{g/mL}$)、泮托拉唑钠 (3.00 $\mu\text{g/mL}$)、枸橼酸铋钾 (14 $\mu\text{g/mL}$)、乙酰水杨酸 (300 $\mu\text{g/mL}$)、对乙酰氨基酚 (55.38 $\mu\text{g/mL}$)、吡哆美辛 (11.20 $\mu\text{g/mL}$)、布洛芬 (704 $\mu\text{g/mL}$) 等在上述浓度时对本试剂的检测没有干扰。

【注意事项】

1. 本产品仅供体外诊断使用, 使用后废弃物按医疗废物处理。
2. 待检样本若不立即检测, 应保存于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 或 -70°C 及以下。
3. 试剂盒各组分使用前请充分融化并摇匀, 离心管内的试剂需离心数秒后使用。
4. 试剂盒对照品可能含有人源物质的组分, 虽已经通过了检测, 但截至目前, 没有任何一项检测可以确保绝对安全, 故仍应将其视为潜在传染源对待。
5. 实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。实验各阶段应在不同试验区进行, 包括PCR扩增试剂准备区、样本处理区及PCR扩增检测区。每个区的仪器设备不得交叉使用; 各区人员流动及空气流向应有严格要求, 最大限度避免交叉污染。PCR操作人员应具有经验和受过培训。
6. 操作过程中用到的生物安全柜、移液器、离心机、实时荧光定量PCR仪等仪器设备应经常用10%次氯酸或70%乙醇及紫外灯交替处理。

7. 实验中废弃的吸嘴应弃于含10%次氯酸的废液缸中，以防止污染。
8. 阴性对照、阳性对照和待检样本平行进行操作后方可进行PCR扩增。
9. 使用本试剂盒检测，请按传染病实验室检查规程操作。

【参考文献】

- [1] Zhuoqi L., Jing S., Lian Z., et al. 2008. Prevalence of A2143G mutation of H. pylori-23S rRNA in Chinese subjects with and without clarithromycin use history. BMC Microbiology. 8: 81. doi:10.1186/1471-2180-8-81.
- [2] 中华医学会消化病学分会幽门螺杆菌学组/全国幽门螺杆菌研究协作组. 2012. 《第四次全国幽门螺杆菌感染处理共识报告》. Chin J Gastroenterol 2012, 17: 618-625.
- [3] Katarine A., Artur L., José N., et al. 2010. Characterization of 23S rRNA domain V mutations in gastric biopsy patients from the eastern Amazon. Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 105: 314-317.
- [4] Ana K., Roberto A., Marcelo M., et al. 2010. Clarithromycin-resistant Helicobacter pylori in Recife, Brazil, directly identified from gastric biopsies by polymerase chain reaction. Arq Gastroenterol. 47: 379-382.
- [5] Francesco V., Margiotta M., Zullo A., et al. 2005. Primary clarithromycin resistance in Italy assessed on Helicobacter pylori DNA sequences by TaqMan real-time polymerase chain reaction. Aliment Pharmacol Ther 23: 429-435.
- [6] Mohammad K., Sadegh G., Abbas D., et al. 2012. Real-time PCR for Helicobacter pylori quantification and detection of clarithromycin resistance in gastric tissue from patients with gastrointestinal disorders. Research in Microbiology 163: 109-113.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海芯超生物科技有限公司

住所：中国（上海）自由贸易试验区李冰路151号5号楼4楼

联系方式：电话：021-51320288 传真：021-51320287 邮编：201203 公司网址：www.outdoivd.com

售后服务单位名称：上海芯超生物科技有限公司

联系方式：服务热线：021-51371392 传真：021-51320287 邮编：201203

生产地址：中国（上海）自由贸易试验区李冰路151号2号楼3楼（质检）、4号楼3楼（生产）、5号楼3楼（质检、研发）

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】