

受理号：CSZ2300044

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：线粒体基因 3243A>G 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：嘉检（广州）生物工程有限公司

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	14

基本信息

一、申请人名称

嘉检（广州）生物工程有限公司

二、申请人住所

广州市南沙区珠江街南江二路6号自编3栋4-5层401-501

三、生产地址

广州市南沙区珠江街南江二路6号自编3栋4-5层401-501

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本产品主要组成成分见表 1。

表 1 产品主要组成成分

组分名称	规格与装量	主要成分
DNA 提取液	1.9 ml/管×1	Tris-HCl、Triton、EDTA
蛋白酶 K	133 μL/管×1	蛋白酶 K、Tris-HCl、CaCl ₂ 、甘油
M3243 PCR 反应液	450 μL/管×1	Taq 酶、UNG、dNTP、M3243 目的基因引物及探针、MT-RNR2 内标基因引物及探针等
M3243 阳性质控品	95 μL/管×1	M3243 突变质粒、MT-RNR2 内参质粒
M3243 阴性质控品	95 μL/管×1	MT-RNR2 内参质粒

(二) 产品预期用途

该试剂盒用于体外定性检测人口腔拭子样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A > G)。

该试剂盒用于线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS) 综合症的辅助诊断, 其检测结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据, 临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

（三）产品包装规格

24 人份/盒。

（四）产品检验原理

基于扩增阻碍突变系统（Amplification Refractory Mutation System, ARMS）结合荧光 PCR 技术，实现人口腔脱落细胞样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点 A > G 突变的检测。针对线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点设计特异性引物，通过分析内标基因与目的基因的 Ct 差值，判断样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点的突变情况。

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、反应预混液、蛋白酶 K、质粒等。这些原材料均是通过外购的方式获得。其中：引物、探针、质粒的序列由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰、纯化方式获得；反应预混液中的 Taq 酶、UDG 酶由原材料供应商克隆表达后获得，dNTP 由原材料供应商化学合成获得。

申请人对各主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性试验筛选出合格供应商，制定了主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

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、重复性参考品以及最低检出限参考品。企业参考品采用临床样本制备而成，其中：阳性参考品 3 份，分别由不同来源的 m.3243A > G 阳性样本组成。阴性参考品 7 份，分别由不同来源的检测范围内的 m.3243A 位点野生型样本、检测范围外的其他位点突变同时 m.3243A 位点野生型样本和非人类基因组样本组成。重复性参考品 3 份，分别由弱阳性样本、最低检出限样本以及阴性样本组成。最低检出限参考品 1 份。

本产品的质控品包括阴性质控品和阳性质控品，用于核酸提取过程的质量控制及检测过程中试剂和仪器的质量控制。申请人开展了质控品赋值研究，进行了质控品的溯源、制备和定值研究，制定了质控品的质量标准。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人开展的反应体系研究包括 DNA 提取液用量研究、蛋白酶 K 用量研究、孵育温度及时间研究、核酸上清液吸取量研究、样本采集刮取次数及样本用量研究、引物与探针用量研究、模板 DNA 用量研究、退火温度研究、循环数研究、仪器基线与阈值设定研究等。通过功能性试验，最终确定了最佳反应体系。另外，申请人通过对试剂盒中试剂及组件的主要生产工艺的研

究结果，确定了最佳生产工艺。

（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、检出限、分析特异性（交叉反应、干扰试验）、核酸提取效率等方面。

申请人提交了质量管理体系下生产的三批产品在两种适用机型（ABI 7500、SLAN-96S）上的性能评估资料。

准确度研究使用三批试剂盒对不同病龄阶段、家族史、其他疾病患者以及健康人来源的口腔脱落细胞样本进行检测，与 Sanger 测序法的阳性符合率 100%、阴性符合率 100%。对不同来源的临床口腔脱落细胞样本与肌肉组织样本进行检测，阳性符合率 100%、阴性符合率 100%。

精密度研究使用三批试剂盒对中、低浓度水平阳性样本和阴性样本开展了重复性、批内、批间、日内、日间、不同操作者间、不同仪器间的精密度研究，结果显示符合率均为 100%，且计算 $\Delta Ct = |Ct_{FAM} - Ct_{VIC}|$ 的变异系数（CV，%）均不大于 15%。表明本产品精密度良好。

检出限研究对不同背景 DNA 浓度下不同突变比例梯度的样本进行 20 次重复检测，以 95%（ $n \geq 20$ ）的阳性检出率作为标准，确定了本产品的检出限为最低可检出 0.1ng/μL DNA 背景下 0.5% 的突变，最高可检出 10ng/μL DNA 背景下 0.5% 的突变。

并通过三批次试剂对不同来源的临床阳性样本进行了检出限的验证。

交叉反应研究使用三批试剂盒对 m.3243A 位点野生型样本、相邻的线粒体突变位点（m.3460G>A、m.3252A>G 和 m.3271T>C）以及采样部位口腔中正常寄生或易并发的其他微生物高浓度水平样本（如化脓性链球菌、表皮葡萄球菌、罗伊氏乳杆菌、白色念珠菌（假丝酵母菌）、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感 2 型病毒、腺病毒、合胞病毒 B 型）开展了交叉反应评价。结果显示上述样本均与本产品不产生交叉反应。

干扰试验研究使用三批试剂盒对临床口腔脱落细胞样本中“最差条件”的不同内源性干扰物质、外源性干扰物质开展了干扰试验评价。结果显示：5%体积全血、0.9mg/mL 粘蛋白、10%体积唾液等内源性干扰物对本产品不产生干扰；1.5mg/mL L-精氨酸、0.9mg/mL 维生素 B1、0.01mg/mL 维生素 B2、0.5%体积维生素 E、10%体积漱口水、10%体积烟草浸出液、模拟绿豆大小口腔内食物残渣、模拟绿豆大小口腔内牙膏残余等外源性干扰物对本产品不产生干扰。

申请人还采用了临床口腔脱落细胞样本进行核酸提取效率研究，通过三批次试剂不同的人口腔脱落细胞样本验证了本

产品的核酸提取效率为核酸浓度大于 0.1ng/ μ L。

(四) 阳性判断值或参考区间研究

阳性判断值研究采用临床来源的口腔脱落细胞样本。阳性判断值的建立和验证共计样本 592 例，来自 MELAS 确诊患者、临床怀疑 MELAS 患者、家族史人员、基因检测 m.3243A>G 阳性患者以及健康人等。采用 ROC 曲线的方式建立产品的阳性判断值，确定本产品的阳性判断值为 $\Delta Ct = |Ct_{FAM} - Ct_{VIC}| = 14.8$ 。

(五) 稳定性研究

申请人采用企业参考品为待测样本，以外观、阴性符合率、阳性符合率、精密度、最低检出限，核酸提取效率为考核指标，对质检合格的同批次试剂开展不同时间点的实时稳定性、使用稳定性（开瓶稳定性、冻融稳定性）和运输稳定性研究，确定了在各种条件下试剂的有效保存时间和条件。结果显示产品的各项稳定性指标均能满足产品说明书声称的要求。其中：实时稳定性研究将三批次试剂储存于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下，分别在第 0、4、8、12、14 个月时进行检测。确定了本产品在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存 12 个月。此外，申请人还对样本稳定性进行了系统的研究。

三、临床评价概述

申请人在首都医科大学附属北京儿童医院、北京大学第一医院、复旦大学附属华山医院、南方医科大学南方医院和湖南省儿童医院共 5 家机构完成了临床试验。采用试验用体外诊断试剂与临床参考标准和临床参考方法等进行比较研究，确认本产品的临床性能。入组病例包括：疑似线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作综合征（MELAS）的患者和其他易混淆疾病的患者，样本类型为口腔拭子，共计入组 490 个病例。

针对试验体外诊断试剂与临床参考标准（结合临床特点、影像学特征、基因致病变异或肌肉病理活检等获得的疾病诊断结果）的比较，共入组确诊 MELAS 疾病的患者 125 例，其他易混淆的疾病患者 365 例。采用试验用体外诊断试剂检测口腔拭子样本，试验结果显示，本产品与临床参考标准比较的临床灵敏度为 87.2%（95%CI: 80.2%，91.9%），临床特异度为 96.9%（95%CI: 94.7%，98.3%），显示申报产品具有良好的临床性能。

针对试验体外诊断试剂与临床参考方法一代测序法的比较，共入组 250 例样本，其中阳性样本 86 例，阴性样本 164 例。采用一代测序方法检测血液样本，采用本产品检测同源口咽拭子样本。试验结果显示，本产品与临床参考方法比较的阳性符合率为 100%（95%CI: 95.7%，100%），阴性符合率为 93.3%

(95%CI: 88.4%, 96.2%)，总符合率为 95.6% (95%CI: 92.3%, 97.5%)，显示试验体外诊断试剂与临床参考方法具有良好的致性。

采用试验体外诊断试剂与一代测序分别检测同一份口咽拭子样本，进行临床检测性能的确证，共入组 433 例样本，其中阳性 110 例，阴性 323 例。试验结果显示，本产品与一代测序比较的阳性符合率为 100% (95%CI: 96.6%, 100%)，阴性符合率为 97.8% (95%CI: 95.6%, 98.9%)，总符合率为 98.4% (95%CI: 96.7%, 99.2%)，显示试验体外诊断试剂具有良好的检测性能。

针对检测不一致的样本，均结合临床诊疗过程中的结果等进行了详细分析。

综上所述，临床试验结果显示试验体外诊断试剂的临床性能满足技术审评要求。

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

线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 (mitochondrial

encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS) 综合征是最常见的线粒体疾病之一。依据《中国线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作的诊治专家共识》，可根据 MELAS 的临床特点和影像学特征提出临床拟诊，发现 mtDNA 或 nDNA 基因致病变异或肌肉病理活检发现线粒体肌病的典型病理改变是诊断 MELAS 的“金标准”。

该产品体外定性检测口腔拭子样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A > G)，用于 MELAS 综合征的辅助诊断，其检测结果仅供临床参考，不能作为临床诊断或排除病例的唯一依据，临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

该产品临床应用的主要受益在于：采用口腔拭子样本进行基因检测，可为 MELAS 综合征的辅助诊断与其他疾病的鉴别诊断提供一种较为简便的基因检测结果，临床医生结合患者的临床表型与其他实验室检测指标等不同临床证据等级进行综合诊断。现有临床试验结果显示，本产品与临床参考标准对比的临床灵敏度为 87.2%，临床特异度为 96.9%；与 Sanger 测序法对比，阳性符合率 100.00%，阴性符合率 97.8%，申报产品的临床性能良好。

(二) 风险评估

根据申请人提供的申报资料，通过对该产品从生产原材料、配制、检测、包装、运输、储存、使用方法及安全注意事项、保存和用后处理等全过程危害判定、风险估计、预防化解，从产品技术要求和使用说明书及企业规章制度对产品质量的全过程控制和风险防范措施，已将产品的安全风险系数降到了验收准则规定的可接受范围内，同时采取降低风险的措施后没有引入新的风险。经综合评价，在目前认知水平上，认为该产品上市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，已在产品说明书中提示以下信息：

1.预期用途：

该试剂盒用于体外定性检测人口腔拭子样本中线粒体MT-TL1 基因 3243 位点突变（m.3243A>G）。

该试剂盒用于线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作 (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS) 综合症的辅助诊断，其检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据，临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

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。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 29 日

附件：产品说明书

线粒体基因 3243A>G 突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：线粒体基因 3243A>G 突变检测试剂盒（荧光 PCR 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人口腔拭子样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点突变(m.3243A>G)。

本试剂盒用于线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS)综合征的辅助诊断，其检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据，临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

人类线粒体 DNA 的遗传遵循 3 条特殊规律：①母系遗传：受精卵中的线粒体仅来自卵细胞，母亲可将因线粒体引起的病理性缺陷传递到所有子代，但只有女儿才能将这类缺陷传到下一代；②异质性：当细胞中 mtDNA 发生突变时，野生型 mtDNA 与突变型 mtDNA 共存的现象被称为线粒体异质性。也就是说，mtDNA 突变既不像常显遗传的“全或无”状态、也不是常隐遗传的“50%的杂合子”状态，而是突变型 mtDNA 与野生型 mtDNA 以不同比例共同存在于同一个线粒体、细胞或器官中。同时，在细胞分裂过程中，线粒体及 mtDNA 随机分布到子细胞中，也会造成不同的细胞含有不同比例的突变 mtDNA；③阈值效应：突变型 mtDNA 占全体 mtDNA 的百分比称为突变负荷(mutation load)，是衡量 mtDNA 突变体异质性程度的重要指标。当突变负荷超过一定范围，将引起线粒体功能障碍，当功能障碍的线粒体达到一定数量后将导致组织器官的功能异常而表现出临床症状，这种现象被称为阈值效应。由于不同组织和器官因其对能量依赖程度的不同，不同组织出现功能异常所需的功能障碍的线粒体突变负荷的比例也不同。因此，相同或不同个体不同组织不同细胞中的 mtDNA 突变负荷是不同的。以上线粒体遗传特征使得携带同一突变的个体呈现不同类型、不同程度的临床表型。因此，临床上开展线粒体疾病的诊断需要结合患者不同的病症与不同的临床证据等级。

人类的 MT-TL1 基因编码线粒体 tRNA^{Leu}(^{UUR})，MT-TL1 基因 m.3243A>G 位点突变是最常见的线粒体基因致病性点突变。其主要的致病机理是 mtDNA 3243 位点突变使 tRNA^{Leu} 基因结构异常，转录终止因子不能结合，导致线粒体蛋白质合成缺陷，线粒体氧化磷酸化受损，能量供应不足。线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作(mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes, MELAS)综合征是最常见的线粒体疾病之一，患者发病年龄跨度很大，从幼年到老年的任何年龄均可发病，发病高峰年龄在 10~30 岁，以卒中样发作、癫痫发作、认知与精神障碍、高乳酸血症、肌肉疲劳无力为主要临床特点，同时常伴有糖尿病、神经性耳聋、胃肠功能障碍等系统病变。卒中样发作首发症状为头痛伴或不伴呕吐、癫痫发作、偏盲或皮质盲、

失语、偏身感觉障碍或偏瘫等；运动不耐受，精神症状，意识障碍等；也可伴随其它异常：身材矮小、毛发异常、神经性耳聋，糖尿病；肾脏多表现为局灶性节段性肾小球硬化；可出现慢性腹泻和恶液质等引起神经系统、肌肉、内分泌、循环、肾脏、血液等系统症状。依据《中国线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作的诊治专家共识》，可根据 MELAS 的临床特点和影像学特征提出临床拟诊，发现 mtDNA 或 nDNA 基因致病变异或肌肉病理活检发现线粒体肌病的典型病理改变是诊断 MELAS 的“金标准”。约 80% 的 MELAS 患者由 m.3243A>G 突变引起。

【检验原理】

本试剂盒基于扩增阻碍突变系统（Amplification Refractory Mutation System, ARMS）结合荧光 PCR 技术，通过优化的反应体系和高特异 Taq 酶的使用，实现人口腔拭子样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点 A>G 突变的检测。本试剂盒针对线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点设计特异性引物，通过分析内标基因与目的基因的 Ct 差值，判断样本中线粒体 MT-TL1 基因 3243 位点的突变情况。

【主要组成成分】

组分名称	规格与装量	主要成分
DNA 提取液	1.9 ml/管×1	Tris-HCl、Triton、EDTA
蛋白酶 K	133 μL/管×1	蛋白酶 K、Tris-HCl、CaCl ₂ 、甘油
M3243 PCR 反应液	450 μL/管×1	Taq 酶、UNG、dNTP、M3243 目的基因引物及探针、MT-RNR2 内标基因引物及探针等
M3243 阳性质控品	95 μL/管×1	M3243 突变质粒、MT-RNR2 内参质粒
M3243 阴性质控品	95 μL/管×1	MT-RNR2 内参质粒

注：1. 不同批号试剂盒的以上组分不可以互换使用。
2. 需自备的试剂：灭菌生理盐水或 PBS 缓冲液。

【储存条件及有效期】

1. -20±5℃ 避光保存，有效期 12 个月。
2. 试剂盒在使用时尽量避免反复冻融，冻融次数不超过 7 次。生产日期和使用期限见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪、SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统

【样本要求】

1. 样本类型：口腔拭子（口腔脱落细胞）。
2. 样本采集：将无菌洁净拭子的头部伸进口腔，刮拭口腔内侧颊内处（腮帮子内侧）15-20 次采集口腔脱落细胞。完成采样后，将沾有口腔脱落细胞的拭子头部伸入装有 1 mL 无菌生理盐水或 PBS 缓冲液的离心管中，并在靠近拭子头一侧的折痕处折断，将拭子头留在管中，盖上离心管盖，密闭送检。
3. 样本的保存及运输：待测样本可立即用于测试，在 2~8℃ 下保存不超过 14 天，也可在 -20℃

±5℃或-70℃±5℃保存不超过12个月。应避免反复冻融，冻融次数不超过5次。样本运送采用2-8℃冷链运输7天以内，或泡沫箱加冰密封运输3天以内。样本提取核酸后，应立即进行检测，否则请置于-20℃±5℃保存，保存时间不超过6个月。

【检验方法】

1. 检测前的准备

应提前15~30min将试剂从-20℃取出，于2~8℃解冻试剂，将各组分涡旋震荡30s，并短暂离心5s；准备水浴锅或金属浴，预热至56℃和95℃~100℃。

2. 核酸提取（样本处理区）

2.1 口腔脱落细胞：将装有口腔拭子的离心管涡旋震荡1min，使口腔脱落细胞彻底洗脱下来，丢掉拭子。取口腔脱落细胞悬液不少于200μL，12000rpm离心10min，弃上清。加入50μL DNA提取液和5μL蛋白酶K重悬细胞沉淀，混匀即可。于56℃孵育5min，再用95℃~100℃做加热处理10min，12000rpm离心10min，吸取上清50μL至1.5mL离心管（注意不要吸取到沉淀），即为所得DNA，冷冻保存。

注：建议采用检测仪器（如核酸定量仪Qubit 4荧光计、分光光度计NanoDrop2000或其他仪器）对提取后的核酸进行测定，核酸的浓度应在0.1~10ng/μL之间（若低于0.1ng/μL建议重新提取，高于10ng/μL的样本核酸建议用纯水稀释后再检测）。提取的核酸可立即加样或置于-20±5℃保存备用。

2.2 阴性质控品：取4μL阴性质控品，加入50μL提取液和5μL蛋白酶K混匀。于56℃孵育5min，再用95℃~100℃做加热处理10min，瞬时离心10s~30s即可。

3. 反应液配置（试剂准备区）

每次检测应同时设置阴性质控品、阳性质控品。

根据待测标本数量n（需包含阴性对照、阳性对照）分装PCR反应液，按照18μL/管分装至PCR反应管/板中，转入样本处理区。

4. 加样（样本处理区）

将待测样本提取的核酸、阴性质控品提取液、阳性质控品按2.0μL/反应，分别加入PCR反应液中，最终总体积为20μL，盖紧管盖或封好膜，瞬时离心数秒使液体集中至管底部，转入核酸扩增区。

取N个（N=待测样本个数+阴性质控品+阳性质控品）PCR反应管，单反应总体系配制如下表：

PCR反应液用量	模板用量	总体系
18μL	2μL	20μL

5. qPCR扩增（核酸扩增区）

5.1 将PCR反应管/板置入定量PCR仪的样品槽，按对应名称设置阳性质控品、阴性质控品和未知样本，并设置样本名称、检测靶标名称；

5.2 荧光检测通道选择：选择FAM通道检测M3243 A>G，选择VIC通道检测内参；淬灭基团选择“none”；参比染料Passive Reference选择“none”。

5.3 反应程序设置

步骤	温度	时间	循环数
----	----	----	-----

1	UNG 酶反应	37℃	2 分钟	1
2	Taq 酶活化	95℃	30 秒	1
3	变性	95℃	10 秒	40
	退火, 延伸, 及荧光采集	58℃	30 秒	

5.4 选择反应体系为 20 μ L;

5.5 设置完毕, 保存文件, 运行反应程序。

6. 数据分析

6.1 基线与阈值的设置

荧光定量 PCR 仪运行结束后, 使用配套软件对本次试验的结果进行分析, 设置如下:

①ABI 7500 机型的基线、阈值设定原则: 反应结束后自动保存结果, 根据分析后图像, 在“Linear”图谱窗口调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值 (用户可根据实际情况自行调整, 建议 Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20, 将 Threshold 的 Value 值设置为阳控最高荧光值的 1/20 (各通道分别设置), 使阈值线位于扩增曲线指数期, 阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线), 点击“Reanalyse”自动获得分析结果。

②SLAN-96S 机型的基线、阈值设定原则: 反应结束后自动保存结果, 根据分析后图像选择默认基线、阈值即可。基线默认设置 6-12, 阈值默认设置 0.12。也可按实际情况调整, 阈值调整原则: Threshold 的 Value 值可设置为阳控最高荧光值的 1/20 (各通道分别设置), 使阈值线位于扩增曲线指数期, 阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线。

6.2 质控标准

序号	质控对照品	质控标准
1	阴性质控品	FAM 通道无明显扩增曲线, VIC 通道有明显的扩增曲线, 且 Ct 值 \leq 26, 结果判断为阴性
2	阳性质控品	FAM 和 VIC 通道均有明显的扩增曲线, 且 FAM 通道 Ct \leq 20, VIC 通道 Ct \leq 20, 且 Δ Ct \leq 14.8, 结果判断为阳性
以上要求须在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验视为无效。		

【阳性判断值】

利用 ROC 曲线法确定本试剂盒的阳性判断值, Δ Ct Cut-off 值 = 14.8。 Δ Ct = |Ct_{FAM} - Ct_{VIC}|。

【检测结果的解释】

序号	FAM 通道	VIC 通道	Δ Ct = Ct _{FAM} - Ct _{VIC}	结果判断	备注
1	有 CT 值且有明显的 扩增曲线	有 CT 值	\leq 14.8	阳性	检测结果为 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G)
2	有 CT 值且有明显的 扩增曲线	有 CT 值	>14.8	阴性	检测结果为未检出 MT-TL1 基因 3243 位 点突变 (m.3243A> G) 或低于试剂盒的 检测下限
3	有 CT 值且有明显的	Ct 显示	/	结果无效	建议重新提取核酸检

	扩增曲线	"undetermined"			测
4	有 Ct 值但无明显的扩增曲线, 或 Ct 显示 "undetermined"	$Ct \leq 26$	/	阴性	检测结果为未检出 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G) 或低于试剂盒的检测下限
5	有 Ct 值但无明显的扩增曲线, 或 Ct 显示 "undetermined"	$Ct > 26$	/	结果无效	建议重新提取核酸检测
6	有 Ct 值但无明显的扩增曲线, 或 Ct 显示 "undetermined"	有 Ct 值但无明显的扩增曲线, 或 Ct 显示 "undetermined"	/	结果无效	建议重新采集样本检测

注: 在进行产品特异性验证时, 当待测样本为非人源样本, FAM 通道有 Ct 值但无明显的扩增曲线, 或 Ct 显示 "undetermined", VIC 通道有 Ct 值但无明显的扩增曲线, 或 Ct 显示 "undetermined", 结果判断为阴性, 未检出 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G)。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒可为临床怀疑或家族史提示与 m.3243A>G 位点相关的线粒体病的辅助诊断与鉴别排除诊断提供基因检测依据, 但不能作为临床诊断的唯一依据, 临床医生应结合患者的临床表型与其他实验室检测指标等不同临床证据等级进行综合判断。
2. 本试剂盒的检测范围为 m.3243A>G 位点突变, 由其他 mtDNA 或 nDNA 基因致病变异引起的 MELAS 综合征不在本试剂盒的检测范围内, 因此本试剂盒检测结果阴性也不能排除患病风险。
3. 对于家系中出现先证者的遵循母系遗传的风险人群, 临床医生应根据实际情况进行系统调查与健康建议, 可考虑对遗传风险人群行 m.3243A>G 检测, 对检测结果为 m.3243A>G 阳性且出现线粒体疾病早期临床表现的个体应及时就医且加强追踪观察; 对检测结果为 m.3243A>G 阳性且未出现典型临床表现的个体可由临床医生开展健康教育及建议。
4. 由于线粒体突变的异质性, 不同组织不同细胞中的 mtDNA 突变负荷不同, 不同样本类型的检测结果可能存在差异。本产品的适用样本类型为口腔拭子样本。
5. 本试剂盒为 m.3243A>G 定性检测试剂盒, 不能检测突变负荷比例。

【产品性能指标】

1. 阳性符合率: 检测 3 份企业阳性参考品, 结果均应为 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G)。
2. 阴性符合率: 检测 2 份试剂盒检测范围内的企业阴性参考品, 结果均应为未检出 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G); 检测 3 份试剂盒检测范围外的企业阴性参考品, 结果均应为未检出 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G); 检测 2 份非人类基因组的的企业阴性参考品, 结果均应为未检出 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G)。
3. 精密度: 平行检测 3 份企业重复性参考品各 10 次, 每份企业重复性参考品的结果均应一致。阴性企业重复性参考品的结果均应为未检出 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G); 最低检出限水平与弱阳性水平的企业重复性参考品的结果均应为 MT-TL1 基因 3243 位点突变 (m.3243A>G), 且 ΔCt 的 $CV \leq 15\%$ 。

4. 试剂盒批内、批间、日内、日间精密度、不同操作者间和不同仪器间精密度结果均应一致，且检测阳性参考品的结果均为阳性，检测阴性参考品的结果均为阴性。
5. 最低检出限：可检出 0.2ng DNA 背景下，突变负荷为 0.5% 的 m.3243A>G 突变。
6. 特异性：本试剂盒经实验验证不会与口腔中常见寄生菌及呼吸道中常见的病原体（如化脓性链球菌、表皮葡萄球菌、罗伊氏乳杆菌、白色念珠菌（假丝酵母菌）、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、肺炎链球菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感 2 型病毒、腺病毒、合胞病毒 B 型）以及相邻的线粒体突变位点（m.3460G>A、m.3252A>G 和 m.3271T>C）有交叉反应。
7. 干扰实验：终浓度为 5% 体积全血、0.9mg/mL 粘蛋白、10% 体积唾液、1.5mg/mL L-精氨酸、0.9mg/mL 维生素 B1、0.01mg/mL 维生素 B2、0.5% 体积维生素 E、10% 体积漱口水、10% 体积烟草浸出液、模拟绿豆大小口腔内食物残渣、模拟绿豆大小口腔内牙膏残余等干扰物质对检测结果均无影响。
8. 临床评价：在 5 家临床试验单位完成临床试验，申报产品与临床参考标准比较的临床灵敏度为 87.2%，临床特异度为 96.9%；申报产品与一代测序比较的阳性符合率为 100%，阴性符合率为 97.8%，总符合率为 98.4%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，实验前请仔细阅读说明书。
2. 实验人员应具有操作经验并接受过专业培训，严格按照说明书操作，按照实验过程严格分区进行，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
3. 为避免潜在的危险性，试验时必须穿上合适的实验服，佩戴一次性手套等防护性措施。
6. 本试剂盒仅适用于规定的仪器和检测系统，未经验证的仪器或检测系统可能影响结果的准确性，如使用本试剂盒说明书以外的仪器或检验系统进行检测，须对新的仪器或检验系统进行充分验证。
4. 每次实验需按要求进行质量控制，试剂盒不同批号试剂不可混用，超过试剂盒有效期不可使用。
5. 不恰当的试剂保存可能会导致假阴性结果。
6. 尽量避免反复冻融试剂盒中试剂，以免影响检测结果。
7. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
8. 提取样本中 DNA 后尽快进行试验，如不能马上试验，所提 DNA 应立即放入 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 或更低温度保存。
9. 试剂盒内用剩的试剂及实验过程中产生的废弃物应按医疗废物进行处理。

【标识的解释】



【参考文献】

1. 北京医学会罕见病分会, 北京医学会神经内科分会神经肌肉病学组, 中国线粒体病协作组. 中国线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作的诊治专家共识[J]. 中华神经科杂志, 2020, 053(003):171-178.DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2020.03.003.
2. 中国神经系统线粒体病的诊治指南[J]. 中华神经科杂志 2015 年 48 卷 12 期, 1045-1051 页, ISTIC PKU CSCD, 2016.DOI:10.3760/cma.j.issn.1006-7876.2015.12.003.
3. 王朝霞. 线粒体病的分子诊断 [J]. 北京医学, 2014, 36(4):3.DOI:CNKI:SUN:BJYX.0.2014-04-004.
4. Wong L J C , Bai R K .Real-time quantitative polymerase chain reaction analysis of mitochondrial DNA point mutation.[J].Methods in Molecular Biology, 2006, 335:187-200.DOI:10.1385/1-59745-069-3:187.
5. Tang S , Wang J , Zhang V W ,et al.Transition to Next Generation Analysis of the Whole Mitochondrial Genome: A Summary of Molecular Defects[J].Human Mutation, 2013, 34(6).DOI:10.1002/humu.22307.
6. Wong L J C , Boles R G .Mitochondrial DNA Analysis in Clinical Laboratory Diagnostics[J].Clinica Chimica Acta, 2005, 354(1-2):1-20.DOI:10.1016/j.cccn.2004.11.003.
7. Shanske S , Wong L J C .Molecular analysis for mitochondrial DNA disorders[J].Mitochondrion, 2004, 4(5-6):403-415.DOI:10.1016/j.mito.2004.07.026.
8. 张小勤.线粒体 DNA3243A→G 异质水平定量检测方法的建立及应用[J].中华医学遗传学杂志, 2014, 31(4):6.DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-9406.2014.04.006.
9. 张哲,赵丹华,刘靖,等.线粒体脑肌病伴乳酸血症和卒中样发作 190 例的临床特征分析[J].中华神经科杂志, 2016.
10. 刘姣姣.MELAS 综合征的临床、影像学及基因突变研究进展[D].河北医科大学 [2024-03-01].DOI:CNKI:CDMD:2.1018.859121.
11. 赵丹华,赵旭彤,邢海英,等.晚发型线粒体脑肌病伴高乳酸血症和卒中样发作临床特点[J].中国现代神经疾病杂志, 2020(3):6.DOI:CNKI:SUN:XDJB.0.2020-03-027.
12. 黄圆圆.儿童线粒体脑肌病 MELAS 的临床研究[D].中南大学,2014.
13. 宋艳梅.线粒体脑肌病的基因突变研究[D].河北医科大学,2012.DOI:10.7666/d.y2105858.
14. 杨莉,邱世彦,徐那,等.儿童 MELAS 线粒体基因突变异质性水平与临床特征的关系[J].青岛大学学报: 医学版, 2020, 56(1):5.DOI:10.11712/jms.2096-5532.2020.56.002.
15. El-Hattab A W , Adesina A M , Jones J ,et al.MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options[J].Molecular genetics and metabolism, 2015(1/2):116.DOI:10.1016/j.ymgme.2015.06.004.
16. 时雯雯,薛凌.线粒体脑病分子遗传学基础研究若干新进展 [J].生命科学, 2017, 29(8):8.DOI:10.13376/j.cbbs/2017098.
17. 耿新倩.m.3243A>G 突变临床表型与线粒体及细胞生物力学功能研究[D].上海交通大学,2018.
18. 王从容.线粒体基因 tRNA^{Leu}(UUR)A3243G 突变糖尿病的多系统临床特征与基因诊断[J]. 2016.
19. 陈刚,李伟,杜卫东,等.一种基于 MELAS 和 MERRF 综合征相关线粒体 DNA 突变位点检测集成芯片的建立 [C]// 中国遗传学会第八次代表大会暨学术讨论会.0[2024-03-01].DOI:ConferenceArticle/5aa07fd9c095d

7222075406d.

20. 刘莉,邵宇权,张宝荣,等.6例 MELAS 临床病理特征和线粒体基因全序列比较分析[C]//中华医学会神经病学分会第七届全国中青年神经病学学术大会论文汇编.2014.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：嘉检（广州）生物工程有限公司

住所：广州市南沙区珠江街南江二路6号自编3栋4-5层401-501

联系方式：020-66288800

售后服务单位名称：嘉检（广州）生物工程有限公司

联系方式：020-66288800

生产地址：广州市南沙区珠江街南江二路6号自编3栋4-5层401-501

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】