

受理号：CSZ2200216

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：遗传性耳聋基因检测试剂盒
(PCR-流式荧光杂交法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：广州达安基因股份有限公司

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.....	10
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

广州达安基因股份有限公司

二、申请人住所

广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

三、生产地址

广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒主要组成成分包括试剂 I (PCR 扩增试剂): LEL PCR 反应液 A、LEL PCR 反应液 B、LEL 酶系、LEL 阳性质控品、LEL 正常质控品、PCR 空白对照, 试剂 II(杂交试剂): LEL 多重微球杂交液、LEL 5×显色工作液、LEL 显色稀释液和杂交空白对照。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测新生儿干血斑样本基因组 DNA 中 4 个遗传性耳聋基因中的 17 个位点, 包括 GJB2 基因的 35 delG、176_191 del16、235 delC、299_300 delAT、511_512 insAACG 位点、GJB3 基因的 538 C>T 位点、SLC26A4 基因的 1174 A>T、1226 G>A、1229 C>T、1975 G>C、2027 T>A、2162C>T、2168 A>G、IVS7-2 A>G、IVS15+5 G>A 位点和线粒体 12SrRNA 基因的 1494 C>T、1555 A>G 位点。

该产品检测结果可用于遗传性耳聋的辅助诊断, 可作为常规物理听力筛查的补充, 特别是可发现常规物理听力筛查无法检出的药物性致聋基因携带者和迟发性耳聋基因携带者。存在

部分听力筛查未通过且听力异常，但本产品检测结果为阴性的情况。检测结果仅代表对部分遗传性耳聋相关基因位点的检测，不作为诊断和排除遗传性耳聋的唯一标准。如需确诊病例，应结合患者其他诊断信息对检测结果进行综合判断，或依据相关的诊疗流程对遗传性耳聋进行诊断。

(三) 产品包装规格

24 人份/盒、48 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒基于流式荧光杂交法的原理，针对 GJB2 基因 35 delG、176_191 del16、235 delC、299_300 delAT、511_512 insAACG 位点；GJB3 基因 538 C>T 位点；SLC26A4 基因 1174 A>T、1226 G>A、1229 C>T、1975 G>C、2027 T>A、2162C>T、2168 A>G、IVS7-2 A>G、IVS15+5 G>A 位点和线粒体 12S rRNA 基因 1494 C>T、1555 A>G 位点共 17 个位点设计 PCR 引物和杂交探针；利用多重 PCR 技术获得生物素标记的 PCR 产物；突变位点的野生型探针（N）和突变型探针（M）与微珠进行共价交联；生物素标记的 PCR 产物与微珠上偶联的探针进行特异性杂交；杂交过程中加入的显色剂能与 PCR 产物上标记的基团发生亲和反应；经过上机检测，设备能直接获得每种探针对应的信号值；根据野生型探针与突变型探针的信号比值对检测结果进

行判断。

本试剂盒添加了相关的防污染组分（尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG/UNG），其作用机理是选择性水解断裂含有 dUTP 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料研究

1. 主要原材料的选择

本产品制备过程中所用的主要原材料包括引物、探针、热启动 Taq 酶、dNTPs、UDG 酶、微球、LEL dpanti-POS、链霉亲和素藻红蛋白、正常人基因组和耳聋杂合质粒，其中正常人基因组、耳聋杂合质粒为申请人自行生产，引物、探针、热启动 Taq 酶、dNTPs、UDG 酶、微球、LEL dpanti-POS、链霉亲和素藻红蛋白为外购。

申请人对主要原材料通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商，制定了各主要原材料质量要求并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品的设置情况

申请人设计了完整的企业参考品，包括阳性参考品 17 份、阴性参考品 6 份、检测限参考品 19 份、重复性参考品 7 份。除

1份阴性参考品由质粒制备而成外，其余48份参考品均由临床新生儿干血斑样本提取的基因组DNA制备而成。各项企业参考品综合用于产品检测准确性、检测限、特异性和重复性评价。

本试剂盒设置了LEL阳性质控品、LEL正常质控品和PCR空白对照，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。其中，LEL阳性质控品为耳聋杂合质粒、LEL正常质控品为正常人基因组、PCR空白对照为纯化水。此外，杂交体系中还设置了杂交监控探针POS，用于监控样本杂交是否正常。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业内部试验确定最佳的生产工艺及反应体系。生产工艺的研究包括PCR反应液、多重微球杂交液、5×显色工作液、显色稀释液的配液工序、分装工序、组装工序以及微球与探针的结合工艺等。反应体系的研究包括各试剂用量、PCR反应条件、杂交反应条件、适用仪器、样本核酸浓度等。

(三) 分析性能评估

本试剂盒分析性能评估内容主要包括：核酸提取或纯化性能、准确度、精密度、检出限、分析特异性等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的多批产品在适用机型上的性能评估资料。

1.核酸提取或纯化性能

在核酸提取或纯化性能研究中，申请人评估了核酸提取或纯化试剂提取的样本核酸纯度和浓度，并在适用仪器上进行验证，结果表明配套使用的核酸提取或纯化试剂的核酸提取效果满足产品使用需求。

2. 准确度

在准确度研究中，申请人分别使用三批试剂对企业参考品及临床样本进行试验验证，结果表明企业参考品的符合率为100%，临床样本与一代测序的符合率满足要求。

3. 精密度

在精密度研究中，申请人分别使用三批试剂对中、低浓度及检测限浓度水平的5个常见突变型和野生型的样本进行检测。由两个操作者，分别在不同的地点，每人每天进行2轮试验，进行为期20天的检测。结果表明日内、日间、批内、批间、不同操作者间、不同地点间的精密度均符合要求。

4. 检出限

在检出限研究中，申请人分别使用三批试剂对试剂盒检测范围内17个不同位点突变型别的样本进行梯度稀释，对系列浓度样本分别进行20次重复检测，以所有型别样本符合率均 $\geq 95\%$ 的浓度作为检出限，确定该产品的检出限为2 ng/ μL ；通过对不同位点突变型别的样本进行检出限验证，最终确认申报

产品检出限为 2 ng/μL。

在线粒体异质率检出限研究中，申请人使用三批试剂对检出限水平下不同异质率的线粒体突变样本检测，以所有型别样本符合率均 ≥ 95% 的异质率确定为本试剂盒的检出限水平下线粒体异质率；通过对不同线粒体位点突变的样本进行检出限水平下的异质率验证，最终确认在检出限 2ng/μL 情况下，线粒体突变样本的异质率为 50%。

5.分析特异性

分析特异性研究包括交叉反应研究和干扰研究。

在交叉反应研究中，申请人分别采用三批试剂对核酸序列相近或具有同源性、待测位点附近的其他突变位点、各基因及突变位点间、非人类基因组、其他耳聋基因样本进行检测，结果显示申报产品均无交叉反应。

在干扰研究中，申请人分别使用三批试剂对样本中可能含有的干扰物质进行评价，结果显示含高浓度的胆红素（20 mg/mL）、甘油三酯（3000mg/dL）、血红蛋白（6g/dL）、胆固醇（5mg/mL）和白蛋白（1.0g/dL）对申报产品的检测结果均无干扰；复合维生素善存片（最大浓度 40mg/mL）及临床常用的血管紧张素转换酶抑制剂类降压药物卡托普利（最大浓度 20mg/mL）对申报产品的检测结果均无干扰。

(四) 阳性判断值研究

申请人采用 1886 例新生儿干血斑样本，利用 ROC 曲线法以及百分位数法对阳性判断值进行确定研究，最终确定本试剂盒各位点不同基因型的阳性判断值参数。申请人进一步采用临床样本进行阳性判断值的验证，确认本试剂盒的阳性判断值设立合理。

(五) 稳定性研究

申请人对申报产品的实时稳定性、使用稳定性、运输稳定性和样本稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本试剂盒及样本的有效保存时间。

货架有效期（实时稳定性）研究：采用三批试剂盒在实际储存温度条件下：试剂 I（PCR 扩增试剂）保存于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，试剂 II（杂交试剂）避光保存于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ ，每到一个时间节点取出进行检测，确定产品在实际储存温度条件下可稳定保存 12 个月。

此外，申请人对申报产品的使用稳定性、运输稳定性和样本稳定性进行了研究，结果显示产品的性能均满足产品说明书声称的要求。

三、临床评价概述

本产品珠海市妇幼保健院、成都市妇女儿童中心医院、南京市妇幼保健院、长沙市妇幼保健院四家临床试验机构进行

临床试验，对比方法为耳聋基因检测临床参考方法 sanger 测序法进行比对，入组人群为新生儿。针对临床检测性能研究，入组病例 10233 例，其中对比方法检测阳性病例 599 例，对比方法检测阴性病例 9634 例。试验结果显示：本产品与对比方法对比，阳性符合率为 100%（95%CI: 99.36%，100%），阴性符合率为 100%（95%CI: 99.96%，100%）。针对耳聋基因筛查试验，临床试验共入组病例 10156 例，其中对比方法检测阳性病例 555 例，其中药物性耳聋基因阳性病例 34 例，迟发性耳聋基因阳性病例 207 例，对比方法检测阴性病例 9601 例，申报产品与对比方法检测结果阳性一致率：100%（95%CI: 99.31%，100%）；阴性一致率 100%（95%CI: 99.96%，100%），试验体外诊断试剂与对比方法检测结果一致性良好。

综上所述，临床试验结果显示本产品的临床性能满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

根据 YY/T 0316-2016《医疗器械 - 风险管理对医疗器械的应用》对产品进行风险分析。

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/收益分析即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.本产品检测结果仅代表对部分遗传性耳聋相关基因位点的检测，不作为诊断和排除遗传性耳聋的唯一标准。如需确诊病例，应结合患者其他诊断信息对检测结果进行综合判断，或依据相关的诊疗流程对遗传性耳聋进行诊断。

- 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

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 12 月 16 日

附件：产品说明书

遗传性耳聋基因检测试剂盒（PCR-流式荧光杂交法）说明书

【产品名称】

通用名称：遗传性耳聋基因检测试剂盒（PCR-流式荧光杂交法）

【包装规格】

24 人份/盒、48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测新生儿干血斑样本基因组 DNA 中 4 个遗传性耳聋基因中的 17 个位点，包括 GJB2（35 delG、176_191 del16、235 delC、299_300 delAT、511_512 insAACG 位点）、GJB3（538 C>T 位点）、SLC26A4（1174 A>T、1226 G>A、1229 C>T、1975 G>C、2027 T>A、2162C>T、2168 A>G、IVS7-2 A>G、IVS15+5 G>A 位点）和线粒体 12SrRNA 基因（1494 C>T、1555 A>G 位点）突变。

该产品检测结果可用于遗传性耳聋的辅助诊断，可作为常规物理听力筛查的补充，特别是可发现常规物理听力筛查无法检出的药物性致聋基因携带者和迟发性耳聋基因携带者。**存在部分听力筛查未通过且听力异常，但本产品检测结果为阴性的情况。**检测结果仅代表对部分遗传性耳聋相关基因位点的检测，不作为诊断和排除遗传性耳聋的唯一标准。如需确诊病例，应结合患者其他诊断信息对检测结果进行综合判断，或依据相关的诊疗流程对遗传性耳聋进行诊断。

遗传性耳聋是临床上最常见的遗传性疾病之一。根据第六次全国人口普查及第二次全国残疾人抽样调查显示我国听力残疾者约为 2054 万，占总残疾人口的 24%。我国每年新增约 3 万先天性耳聋患儿，另外还将新增 3~5 万的迟发性、药物性耳聋患儿，其中约 60% 与遗传因素有关，70% 表现为非综合征型耳聋^[1]。研究表明，中国人群中与耳聋相关常见的致病基因分别为 GJB2、SLC26A4、线粒体 12S rRNA 及 GJB3^[2-3]。GJB2 基因是引起非综合征型耳聋最常见的致病基因，该基因突变导致的耳聋表型多样，主要表现为先天性耳聋，还可表现为非先天性语前聋、语后聋及迟发性耳聋，患者需及时明确病因并尽早接受医学干预，否则会错过听力语言康复训练的最佳时期，最终导致聋哑残疾。SLC26A4 基因是引起迟发性耳聋的主要致病基因之一，与大前庭水管综合征的发生密切相关。迟发性耳聋患者出生时听力可能正常，若有感冒、颅脑外伤、剧烈运动等诱因，可发展成重度耳聋或全聋。线粒体 12S rRNA 基因突变患者对氨基糖甙类药物敏感，使用该类药物可导致“一针致聋”现象，在临床上如果不采用基因筛查方法很难在药物致聋前发现，携带该基因突变患者需终身避免使用氨基糖甙类药物^[4]。GJB3 基因突变主要与迟发性高频听力下降相关，患者需长期密切关注听力状况。

【检验原理】

本试剂盒基于流式荧光杂交法的原理，针对 GJB2 基因 35 delG、176_191 del16、235 delC、299_300 delAT、511_512 insAACG 位点；GJB3 基因 538 C>T 位点；SLC26A4 基因 1174 A>T、1226 G>A、1229 C>T、1975 G>C、2027 T>A、2162C>T、2168 A>G、IVS7-2 A>G、IVS15+5 G>A 位点和线粒体 12S rRNA 基因 1494 C>T、1555 A>G 位点共 17 个位点设计 PCR 引物和杂交探针；利用多重 PCR 技术获得生物素标记的 PCR 产物；突变位点的野生型探针（N）和突变型探针（M）与微珠进行共价交联；生物素标记的 PCR 产物与微珠上偶联的探针进行特异性杂交；杂交过程中加入的显色剂能与 PCR 产物上标记的基团发生亲和反应；经过上机检测，设备能直接获得每种探针对应的信号值；根据野生型探针与突变型探针的信号比值对检测结果进行判断。

本试剂盒添加了相关的防污染组分（尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG/UNG），其作用机理是选择性水解断裂含有 dUTP 的双链或者单链 DNA 中的尿嘧啶糖苷键，形成的有缺失碱基的 DNA 链，在碱性介质以及高温下会进一步水解断裂，从而被消除。

【主要组成成分】

组成		规格	数量	主要组分	
24 人份/ 盒	试剂 I (PCR 扩 增试剂)	LEL PCR 反应液 A	816 μL/管	1 管	特异性引物 (扩增位点: 538C>T、1494 C>T、1555 A>G、35delG、235delC、299_300delAT、511_512 insAACG、2162C>T、2168A>G)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
		LEL PCR 反应液 B	816 μL/管	1 管	特异性引物 (扩增位点: IVS15+5 G>A、IVS7-2 A>G、1174 A>T、1226 G>A、1229 C>T、176_191 del16、1975 G>C、2027 T>A)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
		LEL 酶系	288 μL/管	1 管	热启动 Taq 酶、UDG 酶、三磷酸脱氧核糖核苷
		LEL 阳性质控品	150 μL/管	1 管	耳聋杂合质粒
		LEL 正常质控品	150 μL/管	1 管	正常人基因组
		PCR 空白对照	500 μL/管	1 管	纯化水
	试剂 II (杂交试 剂)	LEL 多重微球杂交液	1080 μL/管	1 管	偶联探针的微球、杂交监控探针、杂交监控探针反向互补序列
		LEL 5×显色工作液	120 μL/管	1 管	链霉亲和素藻红蛋白
		LEL 显色稀释液	480 μL/管	1 管	四甲基氯化铵
		杂交空白对照	500 μL/管	1 管	纯化水
48 人份/ 盒	试剂 I (PCR 扩 增试剂)	LEL PCR 反应液 A	1632 μL/管	1 管	特异性引物 (扩增位点: 538C>T、1494 C>T、1555 A>G、35delG、235delC、299_300delAT、511_512 insAACG、2162C>T、2168A>G)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
		LEL PCR 反应液 B	1632 μL/管	1 管	特异性引物 (扩增位点: IVS15+5 G>A、IVS7-2 A>G、1174 A>T、1226 G>A、1229 C>T、176_191 del16、1975 G>C、2027 T>A)、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
		LEL 酶系	576 μL/管	1 管	热启动 Taq 酶、UDG 酶、三磷酸脱氧核糖核苷
		LEL 阳性质控品	300 μL/管	1 管	耳聋杂合质粒
		LEL 正常质控品	300 μL/管	1 管	正常人基因组
		PCR 空白对照	1.0mL/管	1 管	纯化水
	试剂 II (杂交试 剂)	LEL 多重微球杂交	1080 μL/管	2 管	偶联探针的微球、杂交监控探针、杂交监控

剂	液			探针反向互补序列
	LEL 5×显色工作液	240μL/管	1 管	链霉亲和素藻红蛋白
	LEL 显色稀释液	960μL/管	1 管	四甲基氯化铵
	杂交空白对照	1.0mL/管	1 管	纯化水

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂，仅可使用广州达安基因股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170666 号）。

需自备的仪器：（1）全自动核酸提取仪。广州达安基因股份有限公司生产的全自动核酸提取仪（型号：Smart32，粤穗械备 20140023 号）。（2）扩增/杂交设备：PCR 扩增仪 Veriti™ Dx 96 Thermal Cycler（型号：Veriti™ Dx 96 Thermal Cycler，厂家：Life Technologies Holdings Pte Ltd，国械注进 20172221549）；

质控品说明：LEL 阳性质控品为体外人工合成质粒，LEL 正常质控品为人基因组，使用时应视为具有潜在的传染性，操作和处理均需符合相关法规要求。

其它：杂交空白对照仅用于协助使用者进行杂交过程污染排查，不作为质控品使用。

【储存条件及有效期】

本试剂盒中试剂 I（PCR 扩增试剂）-20±5℃保存；试剂 II（杂交试剂）2~8℃避光保存；有效期为 12 个月。

试剂盒中试剂 I（PCR 扩增试剂）应避免反复冻融，冻融次数建议不超过 4 次；试剂使用开瓶 8 小时内（开瓶温度为 10~30℃，开瓶 4 次以内）其检测性能不受影响；将试剂 I（PCR 扩增试剂）置于-20±5℃冷链箱，试剂 II（杂交试剂）置于 2~8℃冷链箱下运输 96 小时，不影响本试剂盒的检测性能。

试剂盒生产日期及有效期见产品包装标签。

【适用仪器】

液态悬浮芯片检测仪（型号：MagPix，厂家：Luminex Corporation，国械注进 20182222242）、多功能流式点阵仪（型号：Luminex 200，厂家：Luminex Corporation，国械注进 20172221166）

【样本要求】

1. 适用标本类型：新生儿干血斑
2. 标本采集

按现行新生儿足跟血采集方法进行采集：用无菌干棉球擦去第一滴血，从第二滴血开始取样，将滤纸片接触血滴，自然渗透至滤纸片背面，自然晾干呈深褐色，送检。

3. 标本保存

标本密封干燥条件下可 2~8℃保存两个月，-20±5℃保存 5 年。

4. 样本核酸要求

样本核酸（DNA）纯度要求：OD₂₆₀/OD₂₈₀ 应在 1.6~2.0 之间；样本核酸（DNA）浓度要求：应在 2~50ng/μL 之间；核酸冻融次数建议不超过 4 次；核酸可在-20±5℃条件下可保存 1 个月。

【检验方法】

1. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

建议采用广州达安基因股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（粤穗械备 20170666 号）进行核酸提取，具体操作步骤请按照试剂盒说明书指引进行。

本试剂盒中的 PCR 空白对照参与提取，用于对环境进行监控；LEL 阳性质控品以及 LEL 正常质控品不参与提取，用于监测 PCR 扩增体系及探针是否正常工作。

注意：核酸提取或纯化试剂的洗脱液体积为 100 μL。

2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 LEL PCR 反应液 A、LEL PCR 反应液 B 和 LEL 酶系，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 瞬时离心后使用。

单人份扩增体系配制如下表：

PCR 反应管 A			
组分	LEL PCR 反应液 A	LEL 酶系	总体积
用量	34 μL	6 μL	40 μL

PCR 反应管 B			
组分	LEL PCR 反应液 B	LEL 酶系	总体积
用量	34 μL	6 μL	40 μL

按上表配制完成后充分混合，分别配制成 PCR 反应管 A 和 PCR 反应管 B，瞬时离心以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 40 μL 扩增体系分别分装到独立的 PCR 管中，做好标记，备用。

3. 加样（样本制备区）

往装有 PCR 反应管 A 和 PCR 反应管 B 的 PCR 管中分别加入 10 μL PCR 空白对照、10 μL LEL 正常质控品、10 μL LEL 阳性质控品、10 μL 提取后的待测样本核酸，盖紧管盖，振荡混匀并瞬时离心后转移至扩增区。

4. PCR 扩增（扩增区）

将各反应管放入 PCR 仪，按下列条件在 PCR 仪上进行扩增，PCR 扩增循环条件为：

30°C 5 分钟；95°C 15 分钟；94°C 30 秒 → 55°C 45 秒 → 72°C 30 秒，45 个循环；72°C 7 分钟。

PCR 扩增完成后，取出扩增产物，备用。

5. 杂交操作（通风橱内操作）

5.1 杂交前准备

(1) 制备 1×显色工作液

短暂离心 LEL 5×显色工作液，涡旋混匀后再次短暂离心，按每个反应需要 25 μL 显色工作液计算，使用 LEL 显色稀释液对 LEL 5×显色工作液进行 1:4 倍稀释，涡旋混匀，短暂离心后 10~30°C 避光保存，使用前于 55°C 预热 3 分钟。

注意：1×显色工作液可在 2~8°C 避光条件下稳定保存 1 周，显色工作液不宜反复加热。

(2) 仪器预热

打开 Luminex 200 或者 Luminex MagPix，预热 30min。

5.2 杂交反应

(1) 取出 LEL 多重微球杂交液，涡旋约 30sec 使微珠充分重悬后，按每反应 45 μL 分装至 96 孔 PCR 板/八联管中。

(2) 每个样品分别取 2.5 μL A 管产物和 2.5 μL B 管产物加至各反应孔，总体积 50 μL，充分混匀，封板膜密封后（或使用八联管盖紧盖子），按下列条件进行杂交反应：95°C 变性 5min，然后 55°C 杂交 15min。此步可在 PCR 仪上进行，反应热循环程序设置为：

温度	时间
95°C	5min

55°C	Forever
------	---------

注意：杂交空白对照使用方法：在进行杂交过程污染排查时，取 5 μ L 杂交空白对照加至 45 μ L 杂交液中，按杂交反应步骤进行后续操作。

5.3 显色反应

吸取预先预热至 55°C 的 1 \times 显色工作液，加入杂交反应液中，每反应 25 μ L，充分混匀，封板膜密封后，继续于 PCR 仪上 55°C 孵育 15min。

注意：1 \times 显色工作液应预先预热至 55°C，防止加入显色液后杂交温度变低；加 1 \times 显色工作液的过程应该尽量快速，防止开盖后 PCR 仪上的反应液挥发及杂交反应温度不稳定。

6. 上机检测和结果判读

6.1 上机检测

(1) 准备工作

使用 Luminex200 或者 Luminex MagPix 检测前，需提前预热仪器 30min，打开 Plate Heater，使之加热到 55°C。

(2) 输入样品信息

打开 Luminex200 或者 Luminex MagPix 软件 Samples 选项，点击 Create New Samples 输入样品信息。具体的设置步骤参考仪器使用说明书。

(3) 检测

将上述杂交显色后的反应板直接放入 Luminex200 或者 Luminex MagPix 仪器检测，读取信号值（Net MFI）值。

注意：从 PCR 仪取反应板到仪器检测的过程应尽量快速，防止杂交反应液温度降低。

6.2 质量控制

(1) PCR 空白对照：检测结果为所有位点的探针信号值均小于对应的 cutoff 值，所有位点均为低信号。

(2) LEL 阳性质控品：检测结果为 GJB2 基因 35 delG、235 delC、299_300 delAT、511_512 insAACG 位点以及 SLC26A4 基因 1226G>A、IVS7-2 A>G 位点均为杂合突变型，试剂盒范围内其余检测位点均为野生型。

(3) LEL 正常质控品：检测结果为试剂盒检测范围内所有位点均为野生型。

(4) 杂交监控探针 POS：杂交监控探针 POS 的信号值需大于既定 cutoff 值。

(5) 同一次试验中只有 PCR 空白对照、LEL 阳性质控品、LEL 正常质控品、杂交监控探针 POS 同时满足各自的质量控制，才可以进行样本检测结果的判读。

(6) 杂交空白对照：用于杂交过程污染排查。在进行杂交过程污染排查时，杂交空白对照检测结果应为所有位点均为低信号，否则杂交过程存在产物污染。

注意：若各质量控制中发现测定结果与预期不符，请终止操作，检查仪器、操作和试剂情况。

6.3 结果判读

根据每个突变位点对应的野生型探针与突变型探针的信号值比值（N/M），对检测标本突变基因型进行判断，判断标准见【阳性判断值】。

【阳性判断值】

本试剂盒的 cutoff 值主要采用 ROC 法计算得到。当 N 或 M 探针的检测信号值大于或等于对应的 cutoff 值时，判断该样本扩增正常；当杂交监控探针 POS 的信号值大于既定 cutoff 值时，判断该样本杂交正常。

在样本扩增以及杂交均正常的情况下，根据野生型探针与突变型探针的信号值比值（N/M）进行结果判断。N/M 比值与结果判读的标准见表 1 和表 2。

表 1 N/M 比值与结果判读的标准（适用仪器：Luminex MagPix）

检测位点	基因	N 探针 cutoff 值	M 探针 cutoff 值	野生型 N/M 值	杂合突变型 N/M 值	纯合突变型 N/M 值
35 delG	GJB2	800	800	≥1.48	0.68~1.32	≤0.49
176_191 del16	GJB2	1000	1000	≥2.35	0.62~1.82	≤0.32
235 delC	GJB2	800	800	≥1.34	0.55~1.22	≤0.47
299_300 delAT	GJB2	800	800	≥2.52	0.65~2.32	≤0.39
511_512 insAACG	GJB2	800	800	≥1.72	0.65~1.42	≤0.39
538 C>T	GJB3	1000	1000	≥1.6	0.59~1.32	≤0.48
1226 G>A	SLC26A4	800	800	≥1.72	0.69~1.50	≤0.52
1229 C>T	SLC26A4	800	800	≥1.52	0.59~1.21	≤0.42
1174 A>T	SLC26A4	1000	1000	≥1.72	0.65~1.42	≤0.55
IVS15+5 G>A	SLC26A4	1600	1000	≥3.2	1.0~3.0	≤0.68
IVS7-2 A>G	SLC26A4	1000	1000	≥1.6	0.45~1.32	≤0.36
1975 G>C	SLC26A4	1000	1000	≥2.0	0.7~1.6	≤0.4
2027 T>A	SLC26A4	1000	1000	≥2.45	0.99~2.25	≤0.72
2162 C>T	SLC26A4	1000	800	≥3.2	0.85~3.0	≤0.65
2168 A>G	SLC26A4	1000	1000	≥1.8	0.65~1.5	≤0.48
检测位点	基因	N 探针 cutoff 值	M 探针 cutoff 值	野生型 N/M 值	异质突变型 N/M 值	均质突变型 N/M 值
1494 C>T	12SrRNA	1500	1500	≥1.72	0.70~1.4	≤0.69
1555 A>G	12SrRNA	1500	1500	≥1.4	0.50~1.2	≤0.49
杂交监控探针 POS	/	4000		/		/

注：若某个位点的 N/M 值不落在任何一个区间范围，则该位点判读结果为灰区，需要进行复检或者使用一代测序复核。

表 2 N/M 比值与结果判读的标准（适用仪器：Luminex 200）

检测位点	基因	N 探针 cutoff 值	M 探针 cutoff 值	野生型 N/M 值	杂合突变型 N/M 值	纯合突变型 N/M 值
35 delG	GJB2	800	800	≥1.48	0.68~1.32	≤0.49
176_191 del16	GJB2	700	700	≥2.75	0.62~2.58	≤0.32
235 delC	GJB2	600	700	≥1.42	0.55~1.22	≤0.47
299_300 delAT	GJB2	700	700	≥2.72	0.65~2.32	≤0.49
511_512 insAACG	GJB2	700	700	≥2.52	0.65~1.8	≤0.39
538 C>T	GJB3	700	700	≥1.6	0.59~1.32	≤0.48
1226 G>A	SLC26A4	600	600	≥1.72	0.69~1.50	≤0.52
1229 C>T	SLC26A4	600	800	≥1.52	0.59~1.21	≤0.42
1174 A>T	SLC26A4	800	800	≥2.28	0.65~1.62	≤0.50

IVS15+5 G>A	SLC26A4	1200	800	≥4.0	1.0~3.5	≤0.78
IVS7-2 A>G	SLC26A4	600	600	≥1.8	0.45~1.5	≤0.36
1975 G>C	SLC26A4	600	600	≥2.23	0.7~1.8	≤0.4
2027 T>A	SLC26A4	1000	600	≥2.6	0.99~2.3	≤0.72
2162 C>T	SLC26A4	1000	500	≥4.0	0.85~3.7	≤0.65
2168 A>G	SLC26A4	1000	1000	≥1.8	0.65~1.5	≤0.48
检测位点	基因	N 探针 cutoff 值	M 探针 cutoff 值	野生型 N/M 值	异质突变型 N/M 值	均质突变型 N/M 值
1494 C>T	12SrRNA	1500	1000	≥2.5	0.59~1.6	≤0.58
1555 A>G	12SrRNA	1000	1000	≥1.8	0.45~1.6	≤0.44
杂交监控探针 POS	/	4000		/	/	/

注：若某个位点的 N/M 值不落在任何一个区间范围，则该位点判读结果为灰区，需要进行复检或者使用一代测序复核。

【检测结果的解释】

1. 当某位点 N 和 M 探针的检测信号值均小于 cutoff 值时，判断该样本该位点低信号。
2. 当 N 或 M 探针的检测信号值大于或等于对应的 cutoff 值时，判断该样本扩增正常；当杂交监控探针 POS 的信号值大于既定 cutoff 值时，判断该样本杂交正常；在样本扩增以及杂交均正常情况下，根据野生型探针与突变型探针的信号值比值（N/M）进行结果判断。
3. 由于 1226 G>A 和 1229C>T 两位点仅相距 2 个碱基，故本试剂盒的 1226N、1229N 共用同一探针的信号值。当 1226 G>A 或 1229C>T 其中一个位点检测结果判读为纯合突变型时，如检测结果为 1226 G>A 为纯合突变型时，则表明该区段序列与设计的 1226 G>A 突变型探针序列完全匹配，由于此探针序列中的 1229C>T 位点为野生型，因此可直接判定 1229C>T 位点为野生型。
4. PCR 空白对照：用于监测 PCR 扩增及杂交过程是否存在污染或非特异信号（用于测定杂交背景值），所有位点的探针检测信号值均小于各自相应的 cutoff 值，所有位点的检测结果均为低信号。
5. LEL 阳性质控品：用于监测 PCR 扩增体系及探针是否正常工作，检测结果为 GJB2 基因 35 delG、235 delC、299_300 delAT、511_512 insAACG 位点以及 SLC26A4 基因 1226G>A、IVS7-2 A>G 位点均为杂合突变型，试剂盒范围内其余检测位点均为野生型。
6. LEL 正常质控品：用于监测 PCR 扩增体系及探针是否正常工作，检测结果为试剂盒检测范围内所有位点均为野生型。
7. 杂交监控探针 POS：添加于多重微球杂交液中的杂交监控探针（偶联于独立微球，其序列与人类基因组无同源性），为游离的互补核酸片段，用于监测杂交过程。杂交监控探针 POS 的信号值需大于既定 cutoff 值。
8. 结果判读前，请确认杂交监控探针 POS、PCR 空白对照、LEL 阳性质控品、LEL 正常质控品是否满足各自的质量控制，才可以进行样本检测结果的判读。
9. 样品检测结果：试剂盒对被检样品中各位点的基因型分别进行判读，每份样品的检测结果包含 17 个位点的基因型。对于位于常染色体上的位点，每一个位点的检测结果可能有野生型、杂合突变型、纯合突变型、灰区四种情况；对于线粒体 12SrRNA 上的位点，检测结果可能有野生型、异质突变型、均质突变型、灰区四种情况。

1) 以常染色体上 2168A>C 位点在 Luminex 200 设备上结果判读为例，如下表所示：

样本编号	2168N	2168M	2168N/M	判读结果	结果解释
------	-------	-------	---------	------	------

daan001	6672	922	7.24	野生型	2168N 大于 cutoff 值 N 对应的 1000, 故可根据 2168N/M 值进行判读; 2168N/M 为 7.24, 落在野生型区间, 故该样本该位点检测结果为野生型。
daan002	5449.5	5336.5	1.02	杂合突变型	2168N 和 2168M 均大于对应的 cutoff 值 1000, 故可根据 2168N/M 值进行判读; 2168N/M 为 1.02, 落在杂合突变型区间, 故该样本该位点检测结果为杂合突变型。
daan003	1041	7127	0.15	纯合突变型	2168N 和 2168M 均大于对应的 cutoff 值 1000, 故可根据 2168N/M 值进行判读; 2168N/M 为 0.15, 落在纯合突变型区间, 故该样本该位点检测结果为纯合突变型。
daan004	5500	3235	1.70	灰区	2168N 和 2168M 均大于对应的 cutoff 值 1000, 故可根据 2168N/M 值进行判读; 2168N/M 为 1.70, 不落在任何一个区间, 故为灰区, 灰区样本需进行复检, 或使用一代测序复核。

2. 以线粒体 12SrRNA 上 1555A>G 位点在 Luminex200 设备上结果判例为, 如下表所示:

样本编号	1555N	1555M	1555N/M	判读结果	结果解释
daan005	5117	954.5	5.36	野生型	1555N 大于 cutoff 值 N 对应的 1000, 故可根据 1555N/M 值进行判读; 1555N/M 为 5.36, 落在野生型区间, 故该样本该位点检测结果为野生型。
daan006	492.5	6116	0.08	均质突变型	1555M 大于 cutoff 值 M 对应的 1000, 故可根据 1555N/M 值进行判读; 1555N/M 为 0.08, 落在均质突变型区间, 故该样本该位点检测结果为均质突变型。

daan007	4718	4710	1.00	异质突变型	1555N 和 1555M 均大于对应的 cutoff 值 1000, 故可利用比值进行型别判断, 1555N/M 为 1.00, 落在异质突变型区间, 故该样本该位点检测结果为异质突变型。
daan008	3235	1996	1.62	灰区	1555N 和 1555M 均大于对应的 cutoff 值 1000, 故可根据 1555N/M 值进行判读; 1555N/M 为 1.62, 不落在任何一个区间, 故为灰区, 灰区样本需进行复检, 或使用一代测序复核。

3) 检测结果异常时, 可参见下表的解决方案进行问题解决:

异常情况	可能原因	参考解决方案 (若适用)
POS 探针低信号	<ol style="list-style-type: none"> 1. 显色液配制浓度过低 2. 杂交用的 PCR 仪温控异常 3. LEL 多重微球杂交液未重悬彻底 4. 显色环节没有吹打均匀 5. 杂交耗材盖子不紧 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 目视显色液颜色是否较平时过浅。 2. 定期校准 PCR 仪。 3. 借助超声重悬彻底微球。 4. 加入显色液后用移液器反复吹打。 5. 检测耗材是否使用不当。
某些位点低信号	<ol style="list-style-type: none"> 1. PCR 扩增失败 2. 样品浓度、纯度达不到要求 3. 杂交过程 PCR 反应与微球混合不均匀 4. 样品存在罕见未知突变 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 本试剂盒检测限为 2ng/μL, 核对样本核酸浓度是否高于试剂盒检测限。若低于建议提高样本浓度。 2. 核实实验操作记录, 特别核对加样环节、PCR 扩增程序和杂交过程。 3. 使用一代测序验证引物或探针结合位置是否存在突变。
某位点大部分样本落入灰区	<ol style="list-style-type: none"> 1. 实验室 PCR 仪温控不佳 2. 显色后长时间不放入 Luminex 设备读数 3. PCR 扩增部分配置不正确 4. 显色液工作浓度过高 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 定期校准 PCR 仪。 2. 显色后应立即放入 Luminex 设备, 以防冷却存在非特异杂交。 3. 提高样本纯度, 降低样本浓度。 4. 检查实验各环节是否正常。
Luminex 读取结果过程出现磁珠数过低警告	<ol style="list-style-type: none"> 1. 仪器故障 2. LEL 多重微球杂交液分散不均匀, 管壁有吸附微球 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 定期校准, 清洗维护仪器, 定期更换仪器吸样针和导管。检查鞘液体积是否正常, 检查废液是否过多。 2. 40kHz 超声 30s 可彻底重悬吸附在管壁内的微球。
PCR 空白对照出现探针信号大于 cutoff 值的位点	<ol style="list-style-type: none"> 1. 杂交时间过长 2. 实际杂交温度偏低 3. 样本提取过程中交叉污染 4. PCR 扩增过程中交叉污染 5. PCR 产物交叉污染 	<ol style="list-style-type: none"> 1. 当检测样本较多时, 使用排枪加显色液, 避免杂交与显色时间长导致背景信号增高。 2. PCR 实验严格分区, 人员单向流动。 3. PCR 扩增前确认盖紧 PCR 扩增反应管, 排除扩增过程中出现交叉污染。

	6.杂交过程中交叉污染	<p>4.PCR 扩增产物装入密封袋后丢弃，当天处理丢弃 PCR 产物，排除 PCR 产物导致的环境污染。</p> <p>5.杂交过程中增加杂交空白对照进行杂交过程的监控，核实是否杂交过程存在污染，还是杂交前污染。</p> <p>6.打扫实验室后，重新检测 PCR 空白对照扩增产物，并同时加测杂交空白对照，若正常，则可继续进行杂交操作。</p>
--	-------------	---

10.检测结果说明：当检测结果为杂合突变型、纯合突变型、均质突变型、异质突变型时，应报告为耳聋基因筛查“未通过”，当检测结果为所有位点均为野生型时，耳聋基因筛查结果可报告为“通过”。对基因筛查“未通过”，或者基因筛查“通过”但听力筛查“未通过”者，均应建议到具有进一步诊断及遗传咨询资质的医疗单位进行听力学、影像学 and 耳聋基因诊断，以进一步明确诊断，获得更准确的遗传咨询和康复指导。

【检测方法的局限性】

- 1.低于本试剂盒检测限浓度的样品无法检测。
- 2.除检测范围内的 17 个位点外，本试剂盒不能检测 4 个遗传性耳聋基因的其他位点以及其他耳聋基因。
- 3.样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
- 4.若检测范围内某位点附近出现其它突变，检测结果可能为灰区或低信号等，建议采取一代测序方法对该位点复核。
- 5.本试剂盒检测结果为野生型时，仅表示所检测的 17 个位点的结果，不排除被检样本有其它耳聋相关位点突变的可能。
- 6.12Sr RNA 的位点 1494 C>T 与 1555 A>G 存在于线粒体中，人群中野生型样本>>均质突变型样本>异质突变型样本。本试剂盒能检测此三种类型样本，但当异质率低于 50%时，不排除样本检测结果为阴性的可能。
- 7.本试剂盒还增加 1226 G>A 和 1229C>T 同时突变的探针 1226/1229M 用于对异常结果复核，该探针不作为判读的依据。当存在异常（如灰区复检仍判读失败等、该探针信号比其它阳性探针信号显著升高时）样本需使用一代测序法复核。

【产品性能指标】

- 1.国家参考品检测结果：检测本试剂盒检测范围内的耳聋基因突变检测国家阳性参考品（编号为 P01~P05、P09~P20），结果符合相应位点基因型别。检测本试剂盒检测范围外的耳聋基因突变检测国家阳性参考品（编号为 P06~P08）及国家阴性参考品（编号为 N01~N03），结果均为试剂盒检测范围内的所有位点均为野生型。
- 2.使用本试剂盒检测范围内的样本进行检测限的估计、确定和验证，最终确定本试剂盒的检测限为 2ng/μL；在检测限浓度下对线粒体 1494C>T、1555A>G 位点的异质率进行估计、确定和验证，最终确定本试剂盒在检测限浓度下线粒体突变样本的异质率为 50%。
- 3.采用企业参考品和样本进行准确性研究，结果表明试剂盒的准确性为 100%。
- 4.采用三批试剂进行批内、批间、日内、日间、不同操作者、不同地点间精密度研究，结果表明各阳性样本对应的阳性位点 N/M 值的变异系数 CV 值均小于 15%，野生型样本检测结果为野生型。
- 5.根据产品性能评估结果，各位点基因的检测不存在交叉反应。

6.根据产品性能评估结果,含高浓度的胆红素(20 mg/mL)、甘油三酯(3000mg/dL)、血红蛋白(6g/dL)、胆固醇(5mg/mL)和白蛋白(1.0g/dL)的临床样本对检测结果均无干扰。孕妇产前常服用的复合维生素善存片(最大浓度 40mg/mL)及临床常用的血管紧张素转换酶抑制剂类降压药物卡托普利(最大浓度 20mg/mL)对检测结果均无干扰。

7.临床试验入组人群为新生儿,对比方法为耳聋基因检测临床参考方法 sanger 测序法。入组病例 10233 例,其中对比方法检测阳性病例 599 例,对比方法检测阴性病例 9634 例。试验结果显示:本产品与对比方法对比,阳性符合率为 100% (95%CI: 99.36%, 100%), 阴性符合率为 100% (95%CI: 99.96%, 100%)。针对耳聋基因筛查试验,临床试验共入组病例 10156 例,其中对比方法检测阳性病例 555 例,其中药物性耳聋基因阳性病例 34 例,迟发性耳聋基因阳性病例 207 例,对比方法检测阴性病例 9601 例,申报产品与对比方法检测结果阳性一致率: 100% (95%CI: 99.31%, 100%); 阴性一致率 100% (95%CI: 99.96%, 100%)。筛查试验中,纯合型检测例数较少,常染色体仅 235delC、IVS7-2 A>G 位点检出纯合型,其它常染色体位点纯合型未在本次临床试验中检出。

【注意事项】

- 1.临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员,应严格按照说明书要求进行操作;
- 2.稀释和掺杂其他试剂会导致错误的结果,请勿使用其他厂家的试剂;
- 3.显色液是光敏感的试剂,装于避光容器内。在试验过程中常規光条件下并不会影响试验结果,但应避免将之暴露于不必要的强光下;
- 4.实验过程严格分区进行,即试剂准备区、样本处理区和 PCR 检测区,各区的白大衣、手套和帽子等不能带入其它区域,各区仪器设备不能带入其它区域;
- 5.杂交操作应在通风橱内进行,以避免操作人员吸入有刺激性气味气体;
- 6.请使用无菌带滤芯吸头,实验中废弃的吸头应弃于含 10%次氯酸的废液缸中;实验全过程必须带一次性手套;
- 7.实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精清理实验工作台及移液器等相关物品,并用紫外灯照射;
- 8.不同批号的试剂不得混用,请勿使用过期产品;
- 9.仅用于体外诊断。

【参考文献】

1. Quyang XM, Yan D, Yuan HJ, et al. The genetic bases for non-syndromic hearing loss among Chinese. J Hum Genet. 2009 Mar;54(3):131-40.
2. Zhang J, Wang P, Han B, Ding Y, et al. Newborn hearing concurrent genetic screening for hearing impairment-a clinical practice in 58,397 neonates in Tianjin, China. Int J Pediatr Otorhinolaryngol. 2013 Dec;77(12):1929-35.
3. Yuan Y, You Y, Huang D, et al. Comprehensive molecular etiology analysis of nonsyndromic hearing impairment from typical areas in China. J Transl Med. 2009;7:79.
4. Zhao H, Young WY, Yan Q, et al. Functional characterization of the mitochondrial 12S rRNA C1494T mutation associated with aminoglycoside-induced and non-syndromic hearing loss. Nucleic Acids Res. 2005;33(3):1132-1139.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 广州达安基因股份有限公司
住所: 广州市高新技术产业开发区香江路 19 号
联系方式:
售后服务单位名称:
联系方式:

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路19号；
广州市高新技术产业开发区荔枝山路6号；
广州市黄埔区香山路17号B104号房。

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】