[J]. Cell Immunol, 1998, 186(1): 18-27.
[9] Monaci E, Mancini F, Lofano G, et al. MF59-and Al(OH)3-Adjuvanted staphylococcus aureus (4C-Staph) vaccines induce sustained protective humoral and cellular immune responses, with a critical role for effector CD4 T cells at low antibody titers[J]. Front Immunol, 2015, 6: 439.
[10] Dupuis M, Denis-Mize K, Labarbara A, et al. Immunization with the adjuvant MF59 induces macrophage trafficking and apoptosis[J]. Eur J Immunol, 2001, 31(10): 2910-2918.
[11] Hui G, Hashimoto C. The requirement of CD80, CD86, and ICAM-1 on the ability of adjuvant formulations to potentiate antibody responses to a Plasmodium falciparum blood-stage vaccine[J]. Vaccine, 2007, 25(51): 8549-8556.
[12] Nouri A, Laraba-Djebari F. Enhancement of long-lasting immunoprotective effect against Androctonus australis Hector envenomation using safe antigens: Comparative role of MF59 and Alum adjuvants[J]. Vaccine, 2015, 33(43): 5756-5763.
[13] Cantisani R, Pezzicoli A, Cioncada R, et al. Vaccine adjuvant MF59 promotes retention of unprocessed antigen in lymph node macrophage compartments and follicular dendritic cells[J]. J Immunol, 2015, 194(4): 1717-1725.
[14] Vogel FR, Powell MF. A compendium of vaccine adjuvants and excipients[J]. Pharm Biotechnol, 1995, 6(6): 141-228.
[15] Keefer MC, Graham BS, McElrath MJ, et al. Safety and immonogenincity of Env 2-3, a human immunodeficiency virus type 1 candidate vaccine, in combination with a novel adjuvant, MTP-PE/MF59. NIAID AIDS Vaccine Evaluation Group. AIDS Res[J]. Hum Retroviruses, 1996, 12(8): 683-693.
[16] Kahn JO, Sinangil F, Baenziger J, et al. Clinical and immunologic responses to human immunodeficiency virus (HIV) type 1SF2 gp120 subunit vaccine combined with MF59 adjuvant with or without muramyl tripeptide dipalmitoyl phosphatidylethanolamine in non-HIV-infected human volunteers[J]. J Infect Dis, 1994, 170(5): 1288-1291.
[17] Mannino S, Villa M, Apolone G, et al. Effectiveness of adjuvanted influenza vaccination in elderly subjects in northern Italy[J]. Am J Epidemiol, 2012, 176(6): 527-533.
[18] Asa PB, Cao Y, Garry RF. Antibodies to squalene in gulf war syndrome[J]. Exp Mol Pathol, 2000, 68(1): 55-64.
[19] Stanberry LR. Clinical trials of prophylactic and therapeutic herpes simplex virus vaccines[J]. Herpes, 2004, 11(Suppl 3): A161-169.
[20] Corey L, Langenberg AG, Ashley R, et al. Recombinant glycoprotein vaccine for the prevention of genital HSV-2 infection: two randomized controlled trials. Chiron HSV Vaccine Study Group[J]. JAMA, 1999, 282(4): 331-340.
[21] Fu TM, An Z, Wang D. Progress on pursuit of human cytomegalovirus vaccines for prevention of congenital infection and disease[J]. Vaccine, 2014, 32(22): 2525-2533.

(收稿日期:2016-02-23 修回日期:2016-05-06)

·综 述·

结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂相关审评要点

刘容枝 综述,李耀华△ 审校
(国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心,北京 100044)

关键词:结核分枝杆菌复合群; 耐药基因突变; 企业参考品; 分析性能评估
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.036 **文献标识码**:A **文章编号**:1673-4130(2016)18-2598-03

结核病是当前危及人类生命的主要杀手。据世界卫生组织估计,2012 年全球约有 45 万耐多药结核病(MDR-TB)患者,17 万人死于 MDR-TB,全球 1/4 的 MDR-TB 患者在中国[1-3]。鉴于全球耐药结核病的严峻形式,世界卫生组织于 2014 年推出了《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》(下称《手册》),旨在指导耐药结核病的预防、诊断和治疗[4-5]。耐药结核病是指由耐药结核分枝杆菌复合群引起的结核病。实验室药敏试验是确诊耐药结核病的唯一方法。但是,传统的实验室药敏试验周期过长,容易延误治疗。基因型 DST(结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂)采用分子生物学方法检测结核分枝杆菌复合群基因组中与特定耐药相关的突变,可以快速鉴定是否存在耐药相关的突变或耐药,一般在 24 h 内就可出结果,可有效弥补传统药敏试验周期长的缺陷[6-8]。迄今为止,国内外已有多种结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂获准上市。为了规范和指导此类试剂的注册申报,下面总结了此类试剂申报中两项重要的技术性文件(企业参考品和分析性能评估资料)的审评要点。

1 企业参考品

企业参考品主要包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品[9-11]。申请人应详细说明企业参考品中每种菌株/核酸的来源、突变类型、浓度和制备方法等信息。

1.1 阳性参考品 申报产品可检测的所有突变类型均应设置不同浓度的阳性参考品。阳性参考品的突变类型应经过测序

△ **通讯作者**,E-mail:liyh@cmde.org.cn。

方法或已上市同类分型试剂的确认。常见突变类型(建议申请人根据权威机构的文件确定其代表性)的阳性参考品需采用菌株,其他突变类型的阳性参考品可采用结核分枝杆菌耐药菌株基因组或突变质粒,不建议采用临床样本作为阳性参考品。

1.2 阴性参考品　可采用经确认靶序列未发生突变的结核分枝杆菌菌株等作为阴性参考品。

1.3 最低检测限参考品　最低检测限参考品应包括声称的所有突变类型。常见突变类型的最低检测限参考品应采用菌株,其他突变类型可采用含有突变的核酸。

1.4 精密度参考品　精密度参考品至少应包括阴性、弱阳性和中阳性 3 个水平。中阳性参考品可不包括所有突变类型,以常见突变类型为主,但弱阳性参考品必须包括所有突变类型。常见突变类型的精密性参考品应采用菌株,其他突变类型可采用核酸。

2　分析性能评估资料

申请人应提交采用申报产品进行的所有分析性能评估资料,包括具体的试验方法、试验结果、统计分析以及接受标准等详细资料。该类产品建议着重对以下分析性能进行研究[12-17]。

2.1 阳性/阴性参考品符合率　申报产品声称的所有突变类型的阳性参考品均应检出阳性,阴性参考品应检出阴性。

2.2 最低检测限　建议采用 95%(n≥20)的阳性检出率作为最低检测限确定的标准。扩增反应终体系中的突变序列百分比和总核酸浓度 2 个因素对最低检测限的影响较大,终体系中突变序列的百分比越高、所含核酸的数量越多,则突变越容易被检出。而终体系中的这 2 个因素是由临床样本中的结核分枝杆菌复合群耐药菌与野生菌的含量和相对比例决定的。因此,需从以下两个方面考察申报产品的最低检测限。

2.2.1 100%耐药比例下耐药菌株/突变核酸的最低检测浓度　对于常见突变类型,将结核分枝杆菌耐药菌株进行系列稀释,制备不同浓度的耐药菌株样本。对于其他突变类型,可将突变质粒或结核分枝杆菌耐药菌株基因组 DNA 进行系列稀释,制备不同浓度的核酸样本。分别对各浓度样本进行不少于 20 次的重复检测,确定 95%阳性检出时的浓度,即可作为可检测的最低耐药菌株/核酸浓度。

2.2.2 不同菌株/核酸浓度、各种耐药比例的最低检测限　配制不同菌株/核酸浓度、各种耐药比例的混合液:对于常见突变类型,将不同浓度的结核分枝杆菌野生菌株和耐药菌株进行混合,调整野生菌株和耐药菌株的比例,得到含不同菌株浓度、各种耐药比例的菌株混合液。对于其他突变类型,将不同浓度的野生质粒和突变质粒进行混合,调整野生质粒和突变质粒的比例,得到含不同核酸浓度、各种耐药比例的核酸混合液。对各份混合液进行不少于 20 次的重复检测,确定 95%阳性检出时的浓度,即可作为可检测的最低菌株/核酸浓度以及耐药比例。

3　分析特异性

3.1 野生型菌株的交叉反应　采用不同浓度的结核分枝杆菌野生菌株进行验证,结果为阴性。

3.2 申报产品声称的全部突变类型间的交叉反应　采用已知突变类型的耐药菌株或核酸,验证突变类型间的交叉反应,非目标突变类型的检测结果应为阴性。

3.3 核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状、采样部位正常寄生或易并发的其他病原体的交叉反应　鉴于临床样本中可能同时含有结核分枝杆菌复合群、非结核分枝杆菌以及其他病原体,因此,为了证明申报产品检出的阳性结果为结核分枝杆菌复合群耐药基因突变,而非其他分枝杆菌或病原体造成的假阳性结果,应对核酸序列具有同源性、易引起相同或相似临床症状、采样部位正常寄生或易并发的其他病原体进行交叉反应的验证。用于交叉反应研究的其他分枝杆菌和病原体主要包括:堪萨斯分枝杆菌、海分枝杆菌、龟分枝杆菌、偶发分枝杆菌、次要分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、胃分枝杆菌、肺炎链球菌和金黄色葡萄球菌等。

4　干扰物质

4.1 潜在干扰物质　主要包括内源性物质和外源性药物。建议使用医学相关水平的干扰物浓度进行验证。建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度(最差条件)下进行评价。对于内源性物质的干扰,建议申请人选择结核分枝杆菌复合群阴性的临床样本(该临床样本含有所有内源性干扰基质,比如:对于痰液样本,含有粘液、血液等)作为内源性干扰样本,采用申报产品对该临床样本进行检测,结果应为阴性。用于干扰研究的外源性药物主要包括:异烟肼、乙胺丁醇、利福平和吡嗪酰胺等。

4.2 培养物样本的干扰　对于培养物样本,干扰物质主要为适用培养基的干扰,应在最低检测限浓度/阴性样本条件下验证适用培养基对检测结果的影响,明确适用培养基是否对检测结果产生干扰。

5　精密度

精密度的评价方法没有统一的标准,在保证科学合理的前提下,申请人可根据产品的特征或研究习惯自行选择。具体试验方法可参考国内外的相关文件。申报产品的精密度评价主要包括以下内容。

5.1 设立合理的精密度评价周期　例如:连续检测 20 d,每天至少由 2 人完成不少于 2 次检测,以便对批内/批间以及日内/日间等精密度进行综合评价。

5.2 阴性样本　采用靶序列未发生突变的结核分枝杆菌野生菌株进行试验,阴性检出率为 100%(n≥20)。

5.3 弱阳性样本　采用结核分枝杆菌耐药菌株或突变核酸进行试验,耐药菌株或核酸浓度略高于申报产品的最低检测限,阳性检出率应高于 95%(n≥20),弱阳性样本应包括申报产品声称的所有突变类型。常见突变类型采用耐药菌株,其他突变类型可采用含有突变的核酸样本。

5.4 中等阳性样本　采用结核分枝杆菌耐药菌株或突变核酸进行试验,耐药菌株或核酸浓度约为最低检测限的 2 或 3 倍,阳性检出率为 100%(n≥20),可选择申报产品声称的部分突变类型进行验证,但至少应包括 1 株结核分枝杆菌耐药菌株。

6　不同样本前处理方法和核酸提取纯化方法的分析性能要求

该类产品所用临床样本(如:呼吸道样本)的基质比较复杂,临床使用前常需进行样本前处理,并且临床常用的前处理方法也不止 1 种。如果申报产品声称某种适用的临床样本类型可采用几种方法进行样本前处理,申请人应提交采用声称的样本前处理方法与申报产品配合进行的分析性能研究资料,试验项目至少应包括最低检测限。

根据法规要求,核酸提取纯化试剂按照Ⅰ类体外诊断试剂进行管理,产品注册相对容易,这促进了核酸提取纯化试剂在体外诊断试剂中的应用。鉴于该类产品所用临床样本较为复杂,申请人常采用几种市售的核酸提取纯化试剂作为申报产品的配套试剂。如果申报产品声称某种临床样本类型可采用几种方法进行核酸提取纯化,申请人应提交采用声称的核酸提取纯化方法与申报产品配合进行的分析性能研究资料,试验项目

至少应包括最低检测限和精密度。

7 其他需要注意的问题

如果申报产品同时适用于几种机型，应提交采用所有适用机型进行的全项目分析性能研究资料。如果申报产品包括多种包装规格，申请人应说明不同包装规格的性能是否存在差异，如存在差异，应提交不同包装规格的全项目分析性能评估资料。

企业参考品在产品的设计开发、性能验证和生产质控等方面具有重要的作用。在产品设计研发的初期，申请人采用已上市同类产品或其他合理方法制备企业内部参考品，然后采用企业内部参考品选择申报产品适用的主要原材料；在产品成型之后，申请人采用企业参考品对申报产品的分析性能进行验证；在每批产品出厂时，申请人采用企业参考品对生产的每批产品进行质量控制。分析性能评估资料对产品设计开发的结果进行验证，主要考察申报产品的最低检测限、精密度、特异性等技术指标。鉴于该两部分资料在注册申报中的重要性，希望申请人在法规框架下，依托企业自身的研发平台和研发习惯，科学合理地制备企业参考品、进行产品性能评价。

参考文献

[1] 韦琪平. 耐多药结核病研究进展[J]. 医学信息，2014，27(22)：670-671.

[2] 肖和平. 中国耐药结核病的流行现状与治疗对策[J]. 中华结核和呼吸杂志，2010，33(7)：481-482.

[3] 张玲. 肺结核病的诊断和控制耐药结核的新思维[J]. 临床荟萃，2014，29(6)：601-604.

[4] 王伟，刘京铭，李传友. WHO 2014 年版《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》解读之五(耐药结核病实验室检测)[J]. 中国防痨杂志，2015，37(6)：655-658.

[5] 聂文娟，初乃惠. WHO 2014 年版《耐药结核病规划管理指南伙伴手册》系列解读之七(耐多药与广泛耐药结核病的治疗)[J]. 中国防痨杂志，2015，37(7)：800-802.

[6] 张琳琳，杨华，肖和平. 结核分枝杆菌联合药敏试验的研究进展[J]. 中国防痨杂志，2015，37(1)：86-89.

[7] 田际云，武洁，李静，等. 熔解曲线法在结核分枝杆菌药敏试验质量评估中的应用[J]. 中华结核和呼吸杂志，2015，38(2)：105-109.

[8] 欧喜超，夏辉，李强，等. 结核分枝杆菌及利福平耐药核酸扩增检测成本分析[J]. 中国防痨杂志，2013，35(9)：723-728.

[9] 董劲春. 定性检测用体外诊断试剂的企业内部参考品的设置[J]. 放射免疫学杂志，2011，24(1)：50-51.

[10] 毛省侠，郭准. 浅谈体外诊断试剂质量体系中企业参考品的管理[J]. 中国医疗器械信息，2011，17(10)：46-53.

[11] 谷金莲，祁自柏，扬振，等. 第 5 套丙型肝炎病毒抗体诊断试剂国家参考品的研制[J]. 中国生物制品学杂志，2006，19(1)：68-70.

[12] 谭玉华，于婷，李奕辉，等. 时间分辨荧光免疫法风疹病毒 IgG 抗体定量测定试剂盒的研制与性能评价[J]. 国际检验医学杂志，2014，35(4)：472-474.

[13] 徐伟文. 体外诊断试剂研制常用技术指标之分析性能评估[J]. 分子诊断与治疗杂志，2010，2(2)：140-144.

[14] 单咏梅，杨凡，万海英. LIAISON 全自动化学发光仪测定 25-羟基维生素 D 分析性能评估[J]. 国际检验医学杂志，2012，33(10)：1252-1253.

[15] 黄妩姣，黄宪章，庄俊华，等. CLSI EP12-A2 文件在 HBeAb 定性检测性能评价中的应用[J]. 检验医学，2012，27(11)：900-903.

[16] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline-Second Edition[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2008.

[17] Clinical and Laboratory Standards Institute. EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline-Second Edition[S]. USA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2005.

(收稿日期：2016-04-03 修回日期：2016-06-11)

·综 述·

NF-κB 在类风湿性关节炎中的作用及调控机制

王 晨 综述，程艳杰 审校

(大连医科大学附属第一医院检验科 116011)

关键词：NF-κB； 类风湿性关节炎； 促炎作用

DOI：10.3969/j.issn.1673-4130.2016.18.037 **文献标识码**：A **文章编号**：1673-4130(2016)18-2600-04

类风湿性关节炎(RA)是 1 种慢性、系统性自身免疫性疾病，可累及人体许多组织与器官，对关节的破坏尤为严重。主要病理特征为炎性细胞浸润、滑膜组织增生、血管生成、血管翳形成、软骨的破坏及骨的侵蚀。目前认为炎性反应介质的持续作用是 RA 病变加重的主要原因。NF-κB 是 1 种影响广泛的转录因子，能促进多种基因转录和表达，与炎性反应、免疫应答及细胞增生、分化和凋亡等重要的生理病理过程密切相关。NF-κB 在 RA 的发病中起重要的调节作用，主要通过调控细胞因子(TNF-α、IL-1β)、基质金属蛋白酶 MMPs(MMP-3、MMP-9)、血管生成因子(VEGF)、诱导酶(COX-2、iNOS)等基因表达，参与关节炎性反应及损伤反应等病理进程。本文就 NF-κB 在 RA 中的作用及调控机制予以综述。

1 NF-κB 概述

NF-κB 于 1986 年由 Sen 和 Baltimore 发现，得名于它能够与 B 细胞免疫球蛋白 κ 轻链基因的增强子 κB(GGGACTTTCC)特异结合，并能促进 κ 基因表达的核蛋白因子，故称之为核因子 κB，是近年发现的最重要的转录因子之一。NF-κB 存在于多种细胞类型中，调控的靶基因包括免疫相关受体、细胞因子、炎性因子、黏附分子、急性期蛋白等。

1.1 NF-κB 的分子结构 NF-κB 是真核细胞转录因子 Rel 家