

受理号：CSZ2200202

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人类 ONECUT2/VIM 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：广州市基准医疗有限责任公司

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.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

广州市基准医疗有限责任公司

二、申请人住所

广州市国际生物岛螺旋三路 8 号 502 单元

三、生产地址

广州市国际生物岛螺旋三路 8 号 401、501、502、602 单元

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

组分	包装规格 (40人份/盒)	主要成分
扩增液 B1	60μL	ACTB/ONECUT2/VIM 引物、探针
扩增液 B2	500μL	DNA 聚合酶、dNTP、MgCl ₂
扩增液 B3	40μL	ROX
阴性质控	25μL	正常细胞 DNA
阳性质控	25μL	正常细胞 DNA、膀胱癌细胞 DNA

注：试剂盒不同批次试剂组分不可互换。具体内容详见产品说明书。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人尿脱落细胞样本 **ONECUT2** 和 **VIM** 基因的甲基化水平。

本试剂盒适用于疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断。

尿路上皮癌是起源于尿路上皮的一种恶性肿瘤，是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一，可发生在肾盂、输尿管、膀胱等。发生

在下尿路的膀胱尿路上皮癌占绝大多数，约为 80~90%；发生于上尿路的肾盂癌和输尿管癌统称为上尿路尿路上皮癌。研究发现，ONECUT2 和 VIM 基因甲基化水平与尿路上皮癌的发生和发展关系密切。

本试剂盒是基于尿脱落细胞样本采用荧光 PCR 方法对 ONECUT2 和 VIM 基因甲基化水平进行检测，适用于有血尿、膀胱刺激症等临床症状，或经影像学等非侵入性方法显示异常，临床可能需进一步检查的疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断，尤其是经影像学等非侵入性方法无法决策病例是否进行膀胱镜检查的辅助诊断。可为患者提供一种尿路上皮癌的无创辅助诊断选择，但不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据。临床医生应结合患者病情及其它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

40 人份/盒

(四) 产品检验原理

本试剂盒检验原理主要包含 DNA 提取、转化及荧光定量 PCR 三个步骤。

尿脱落细胞提取的 DNA 样本利用亚硫酸氢盐的方法对基因

组 DNA 的胞嘧啶进行转化，未发生甲基化的胞嘧啶会转化为尿嘧啶，而发生甲基化的胞嘧啶则保持不变。

荧光定量 PCR 是使用三重荧光 PCR 的方法在同一个反应孔中检测 ACTB 基因保守序列及 ONECUT2、VIM 基因的甲基化情况。通过设计保守区域的引物来扩增 ACTB 基因，作为内参基因评估样品 DNA 是否足量、样品 DNA 质量及亚硫酸氢盐转化操作是否合格。通过特异性的甲基化引物分别扩增 ONECUT2 和 VIM 基因，由不同荧光标记的荧光探针报告扩增信号。根据 ONECUT2 与内参基因 ACTB 的 Ct 差值 (Δ Ct 值) 及 VIM 基因 Ct 值，分别与 Cut-Off 值进行比较，获得样本的甲基化情况。

本试剂盒提供阴性质控、阳性质控，用于每次检测过程中试剂和仪器的质量控制。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括 dNTP、Taq 酶、引物和探针。这些原材料均是通过外购的方式获得。

其中引物、探针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；Taq 酶由原材料供应商克隆表达后

获得；dNTP 由供应商化学合成获得。

申请人对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

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品以及检测限参考品。

企业参考品包括 ONECUT2 基因和 VIM 基因相应位点甲基化阳性的样本，这些样本的靶标基因甲基化状态均经过测序方法验证。

阳性参考品包括 6 种，分别命名为阳性参考品 P1-P6，由涵盖 ONECUT2 基因和 VIM 基因不同甲基化比例的样本组成。

阴性参考品包括 6 种，分别命名为阴性参考品 N1-N6，由不含靶标基因甲基化的样本组成，包含常见干扰物质及其他易共存甲基化基因参考品。

精密度参考品包括 2 种，分别命名为 J1-J2，其中 J1 为不含靶标基因甲基化的阴性样本，J2 为含有靶标基因甲基化的弱阳性样本。

检出限参考品 1 种，命名为 L，为最低检出限水平样本。

本试剂盒同时设置了阳性质控和阴性质控,用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。此外,每个样本均检测内参基因 ACTB,用于结果的判读及评估样本的质量。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒反应体系的研究包括引物/探针浓度的确定、Taq 酶用量的确定、镁离子浓度的确定、dNTP 浓度的确定、样本及 PCR 反应体系体积的确定、参比染料浓度的确定、退火温度/时间的确定、变性温度/时间的确定、循环数的确定、基线及阈值的确定等。通过功能性实验,最终确定了最佳反应体系。

申请人根据试剂盒中试剂及组件的主要生产工艺的研究结果,确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括试剂盒外观、准确度(阴性符合率、阳性符合率)、分析特异性(交叉反应、干扰实验)、最低检出限与精密度五个方面。

准确度评估是通过使用三批产品对 6 支阴性参考品进行阴性符合率测试,对 6 支阳性参考品进行阳性符合率测试。同时还收集了若干例经临床确诊为泌尿系统良性疾病或尿路上皮癌的临床样本,进行真实临床样本的阴性/阳性符合率的测试,以评

估产品检测的准确度。测试结果均 100% 符合。

分析特异性评估包括对经临床确诊为非尿路上皮癌的样本，包括泌尿系良性疾病，其他泌尿系和非泌尿系恶性肿瘤（前列腺癌、肾癌、膀胱神经内分泌肿瘤、肠癌、肝癌、黑色素瘤、卵巢癌、肺癌）进行的交叉反应测试；对 12 种与尿液相关的内源和外源性潜在干扰物质（吉西他滨、吡柔比星、丝裂霉素 C、白色念珠菌、大肠杆菌、氯化钠、金色葡萄球菌、人血清白蛋白、抗环血酸、非结合型胆红素、酒精、血红蛋白）进行了不同浓度下的对比测试，分析干扰物质在高浓度条件下分别对阴性、弱阳性样本检测结果的影响。结果表明产品特异性良好，均未产生非特异性反应。

最低检出限的评估，分别进行了建立和验证研究。使用适用于本申报产品的核酸提取试剂对靶标基因甲基化阳性样本分别进行核酸提取，然后配制一系列从低值到高值甲基化率的样本，分别重复检测 20 次，建立了产品的最低检出限（LOD），并使用 3 批申报试剂进行了验证。

精密度的评估，是通过使用多批产品检测细胞系/临床样本，对批内、日间（20 天）、不同批号间、不同仪器间、不同操作者间以及不同实验室间的精密度分别进行了统计分析，结果表明，

ACTB、ONECUT2、VIM 各基因扩增 Ct 值的变异系数 (CV) 均应 $\leq 5\%$ 。

申请人采用临床尿液样本进行了核酸提取试剂盒性能研究, 并根据与该产品的组合性能研究结果, 确定推荐的核酸提取试剂符合检测要求。

(四) 阳性判断值研究

本研究分为阳性判断值建立和验证两部分。纳入的阳性病例 286 例, 包括膀胱癌、肾盂癌、输尿管癌三种尿路上皮癌初诊患者; 阴性病例共纳入 386 例, 包括泌尿系统良性疾病和泌尿系统其它恶性肿瘤以及非泌尿系统恶性肿瘤, 共计 672 例。阳性判断值建立是通过 ROC 曲线分析比较几种不同的双基因联合方法的诊断性能来确定双基因联合判定方法和相应的阳性判断值。然后再通过 ROC 曲线法采用独立验证集对阳性判断值进行验证, 最终确定产品的阳性判断值为: VIM 基因 Ct 值为 38.6, ONECUT2 基因 ΔCt 值为 5.7。

(五) 稳定性研究

申请人对产品的货架稳定性 (实时稳定性)、运输稳定性、使用稳定性 (包括开瓶稳定性、冻融稳定性) 及样本稳定性 (包括尿液、尿液提取 DNA 及转化后 DNA 稳定性) 进行了研究。

货架有效期稳定性：将三批试剂盒置于规定储存条件下放置 0、6、8、9、10、12 和 13 个月，每一时间节点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果表明产品有效期可达 12 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性、使用稳定性和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

本产品在中山大学孙逸仙纪念医院、北京大学第一医院、华中科技大学同济医学院附属同济医院、西安交通大学第一附属医院四家临床试验机构进行临床试验，采用试验体外诊断试剂与临床参考标准进行比较研究，确认本产品的临床性能。其中，尿路上皮癌和其它恶性肿瘤病例采用病理诊断确诊，其它疾病根据相关诊疗指南进行综合诊断确诊。入组病例为尿路上皮癌疑似病例，样本类型为尿液。

产品临床灵敏度和特异度评价共纳入临床有效病例 1172 例，其中尿路上皮癌病例 429 例（覆盖尿路上皮癌所有分期及病理分型），非尿路上皮癌的其他病例 743 例（包括其它易产生干扰的肿瘤及各种良性疾病病例）。试验结果显示：本产品临床灵敏度为 89.74% (95%CI: 86.51%-92.27%)，特异度为 92.46% (95%CI:

90.34%-94.15%),总符合率为 91.47%(95%CI: 89.73%-92.93%)。

上述结果显示试验体外诊断试剂具有较好的临床灵敏度和特异度, 满足临床使用需求。

此外, 临床试验还纳入 302 例尿路上皮癌疑似病例, 采用试验体外诊断试剂与测序进行比较研究, 确认本产品的临床检测性能。试验结果显示: 针对 VIM 基因, 阳性符合率为 96.30% (90.86%-98.55), 阴性符合率为 98.45% (95.55%-99.47%), 总符合率为 97.68% (95.29%~98.87%); 针对 ONECUT2 基因, 阳性符合率为 100.00% (96.26%-100.00%), 阴性符合率为 100.00% (98.14%-100.00%), 总符合率为 100.00% (98.74%-100.00%)。上述结果显示两者之间具有良好的一致性, 本产品临床检测性能满足要求。

另外, 采用试验体外诊断试剂对 30 例尿路上皮癌患者手术前后的样本进行监测, 27 例样本术前检测结果为阳性, 其中 25 例术后检测结果为阴性; 2 例术后检测结果仍为阳性, 对其随访后发现为复发患者; 表明尿路上皮癌患者手术切除后尿液中甲基化水平降低。

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》对人类 ONECUT2/VIM 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）进行产品受益风险判定。

（一）受益评估

该产品适用于疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断。适用于有血尿、膀胱刺激症等临床症状，或经影像学等非侵入性方法显示异常，临床可能需进一步检查的疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断，尤其是经影像学等非侵入性方法无法决策病例是否进行膀胱镜检查的辅助诊断。可为患者提供一种尿路上皮癌的无创辅助诊断选择，但不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据。临床医生应结合患者病情及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。其临床应用的主要受益在于：该产品为临床上疑似尿路上皮癌的患者提供了一种辅助诊断方法的选择，检查结果为阳性的患者患有尿路上皮癌的可能性大，从而促进这部分人群顺应内镜检查，获得及时的诊断和治疗。依据现有的临床试验结果，其对尿路上皮癌的诊断灵敏度为 89.74%，特异度为 92.46%。

（二）风险评估

该试剂盒已知和可预见的安全风险主要有以下几个方面：

1. 与预期用途有关的风险，例如本产品不能作为尿路上皮癌早期诊断或确诊的依据，临床医生未结合其它诊断方法进行综合诊断。

2. 与生产过程相关的风险，例如说明书印刷错误。

3. 与储存或运输相关的风险，例如在不正确的储存和运输条件下储存、运输试剂。

4. 与使用有关的风险，例如使用仪器和试剂时没有按照说明书进行操作。

5. 生物危险，例如使用后或失效的产品直接丢弃或产品使用过程中产生的废弃物未按照要求按医疗废弃物统一销毁理。

通过对申报产品从生产原料、配制、检测、标志、包装、运输、储存、使用方法及安全注意事项、保存和使用处理等全过程危害判定、风险评估、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控措施，已将产品的风险系数降低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。在目前认知水平上，认为该产品上市带来的受益大于风险。

尽管目前认为该试剂盒的受益大于风险，但是为保障用械安全，基于对主要剩余风险的控制已在该试剂盒说明书提示以下信

息:

1. 预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人尿脱落细胞样本中 ONECUT2 和 VIM 基因的甲基化水平。

本试剂盒适用于疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断。

本试剂盒是基于尿脱落细胞样本采用荧光 PCR 方法对 ONECUT2 和 VIM 基因甲基化水平进行检测，适用于有血尿、膀胱刺激症等临床症状，或经影像学等非侵入性方法显示异常，临床可能需进一步检查的疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断，尤其是经影像学等非侵入性方法无法决策病例是否进行膀胱镜检查的辅助诊断。可为患者提供一种尿路上皮癌的无创辅助诊断选择，但不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据。临床医生应结合患者病情及其它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：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检查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医疗器械产品注册,属于优先审批产品。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》(中华人民共和国国务院令 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 01 月 25 日

附件: 产品说明书

人类 ONECUT2/VIM 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：人类 ONECUT2/VIM 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

40 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人尿脱落细胞样本中 ONECUT2 和 VIM 基因的甲基化水平。

本试剂盒适用于疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断。

尿路上皮癌是起源于尿路上皮的一种恶性肿瘤，是泌尿系统最常见的恶性肿瘤之一，可发生在肾盂、输尿管、膀胱等^[1-2]。发生在下尿路的膀胱尿路上皮癌占绝大多数，约为 80~90%；发生于上尿路的肾盂癌和输尿管癌统称为上尿路尿路上皮癌（UTUC）^[3-4]。研究发现，ONECUT2 和 VIM 基因甲基化水平与尿路上皮癌的发生和发展关系密切^[2]。

本试剂盒是基于尿脱落细胞样本采用荧光 PCR 方法对 ONECUT2 和 VIM 基因甲基化水平进行检测，适用于有血尿、膀胱刺激症等临床症状，或经影像学等非侵入性方法显示异常，临床可能需进一步检查的疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断，尤其是经影像学等非侵入性方法无法决策病例是否进行膀胱镜检查的辅助诊断。可为患者提供一种尿路上皮癌的无创辅助诊断选择，但不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据。临床医生应结合患者病情及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

目前尿路上皮癌的主要诊断方法包括膀胱镜检查、影像学检查、尿脱落细胞学检查、荧光原位杂交（FISH）以及肿瘤标记物检查。膀胱镜检查结合活检组织病理为尿路上皮癌诊断的金标准，但是该检查方法具有侵入性，容易产生并发症，患者依从性

低^[5]。

【检验原理】

本试剂盒检验原理主要包含 DNA 提取、转化及荧光定量 PCR 三个步骤。

尿脱落细胞提取的 DNA 样本利用亚硫酸氢盐的方法对基因组 DNA 的胞嘧啶进行转化，未发生甲基化的胞嘧啶会转化为尿嘧啶，而发生甲基化的胞嘧啶则保持不变。

荧光定量 PCR 是使用三重荧光 PCR 的方法在同一个反应孔中检测 ACTB 基因保守序列及 ONECUT2、VIM 基因的甲基化情况。通过设计保守区域的引物来扩增 ACTB 基因，作为内参基因评估样品 DNA 是否足量、样品 DNA 质量及亚硫酸氢盐转化操作是否合格。通过特异性的甲基化引物分别扩增 ONECUT2 和 VIM 基因，由不同荧光标记的荧光探针报告扩增信号。根据 ONECUT2 与内参基因 ACTB 的 Ct 差值 (ΔCt 值) 及 VIM 基因 Ct 值，分别与 Cut-Off 值进行比较，获得样本的甲基化情况。

ACTB、ONECUT2、VIM 对应的荧光探针报告基因及淬灭基团见表 1。

本试剂盒提供阴性质控、阳性质控，用于每次检测过程中试剂和仪器的质量控制。

表 1 各基因对应的荧光探针报告基因及淬灭基团

荧光探针名称	报告基团	淬灭基团
VIM 荧光探针	FAM	BHQ-1
ONECUT2 荧光探针	NED	BHQ-2
ACTB 荧光探针	VIC	BHQ-1

【主要组成成分】

本试剂盒组成如表 2 所示，包括三支检测试剂与两支质控。

表 2 试剂盒主要组成成分

组分	包装规格 (40 人份/盒)	主要成分
扩增液 B1	60 μ L	ACTB/ONECUT2/VIM 引物、探针
扩增液 B2	500 μ L	DNA 聚合酶、dNTP、MgCl ₂
扩增液 B3	40 μ L	ROX

阴性质控	25 μ L	正常细胞 DNA
阳性质控	25 μ L	正常细胞 DNA、膀胱癌细胞 DNA

注：

1. 试剂盒不同批次试剂组分不可互换。
2. 检测需要但未提供的试剂包括：细胞保存液、核酸提取或纯化试剂、核酸浓度测定试剂 Qubit® dsDNA HS Assay Kit、甲基化检测样本前处理试剂、TE 缓冲液。
3. 检测需要但未提供的耗材包括：1.5mL 离心管（无核酸酶）、滤芯吸头、96 孔 PCR 板（封口膜、压膜器）。
4. 检测需要但未提供的仪器包括：Qubit 荧光计、台式离心机、涡旋混匀仪、掌上离心机、移液器。

【储存条件及有效期】

试剂盒有效期为 12 个月，开封后应在 3 个月内使用。

试剂盒于-20℃ \pm 5℃储存，其中扩增液 B1、B3 应避光储存。可经防水防震材料包裹后采用泡沫保温箱加干冰的方式运输，开箱时温度应不超过-15℃，运输时间不超过 5 天。反复冻融次数不超过 5 次。

【适用仪器】

Applied Biosystems 7500 型定量 PCR 仪。

【样本要求】

尿脱落细胞样本的采集、制备和保存要求：

1. 随机尿液样本的采集、保存：

推荐使用广州市基准医疗有限责任公司生产的细胞保存液（粤穗械备 20200334）进行尿液采集和保存。采集的尿液不少于 100mL。新鲜采集的尿液样本在细胞保存液中 2~8℃保存不超过 5 天，常温（10~30℃）下保存不超过 72 小时。

2. 尿脱落细胞样本制备：

取 100mL 新鲜采集的尿液样本（含细胞保存液），将尿液颠倒混匀后平均转移

至2个50mL离心管中，3000g离心10min，丢弃上清。用1mL PBS缓冲液重悬沉淀后转移至2mL离心管中，3000g离心10min洗涤沉淀，丢弃上清，获得尿脱落细胞样本。获得尿脱落细胞样本后，如不能及时进入下游检测，应置于-60℃以下保存，保存时间不超过24个月。

【检验方法】

一、尿脱落细胞样本DNA的提取

推荐使用凯杰公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：国械备20140005）、广州市基准医疗有限责任公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备20191359号）提取尿脱落细胞样本DNA。DNA样本采用Qubit荧光计定量，总量应≥50ng；提取的DNA样本应尽快检测，建议-20℃±5℃保存不超过24个月，样本冻融不要超过5次。

二、亚硫酸氢盐转化

亚硫酸氢盐转化DNA样本量：50ng。

阴性质控品和阳性质控品各取5μL，与样本同步进行转化。

推荐使用广州市基准医疗有限责任公司生产的甲基化检测样本前处理试剂盒（备案号：粤穗械备20201325号）对提取的尿脱落细胞DNA样本、阴性质控、阳性质控进行亚硫酸氢盐转化、脱磺反应、纯化洗涤、洗脱获得转化后的DNA。建议洗脱液体积为15μL，最终获得产物体积≥10μL。转化的DNA样本应尽快检测，若不立即检测，建议-20℃±5℃保存不超过5天。

三、荧光PCR检测

1. 试剂准备：取出扩增液B1、扩增液B2、扩增液B3平衡至室温，混匀备用。

*样本检测应与NTC（TE缓冲液）、阴性质控、阳性质控同步检测。

2. PCR反应液的准备：

按表3加入各组分。

表3 PCR反应液准备

组分	1个反应	5个反应	10个反应	20个反应
----	------	------	-------	-------

	加样体积	加样体积	加样体积	加样体积
扩增液 B1	1.5 μ L	7.5 μ L	15 μ L	30 μ L
扩增液 B2	12.5 μ L	62.5 μ L	125 μ L	250 μ L
扩增液 B3	1 μ L	5 μ L	10 μ L	20 μ L
总体积	15 μ L	75 μ L	150 μ L	300 μ L

注：配制好的 PCR 反应液应立即使用，扩增液 B1、扩增液 B2、扩增液 B3 使用完毕后应立即复冻。

3. PCR 反应板准备：在 96 孔板每个反应孔加入 15 μ L PCR 反应液和 10 μ L 转化后 DNA。加样完成后，使用压膜器将 96 孔板封口膜进行密封加固，置于离心机中 1000 \times g(rcf)，离心 1min。

4. PCR 扩增

将 PCR 反应板放入 ABI7500 PCR 仪中，在软件进行设置：参比荧光选择 ROX，ONECUT2 选择 NED-NFQ-MGB 通道，VIM 选择 FAM-NFQ-MGB 通道，ACTB 选择 VIC-NFQ-MGB 通道，按表 4 设置荧光定量 PCR 反应程序。

表 4 PCR 反应程序

步骤	温度	时间	升/降温速率	循环数	荧光信号收集
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min	100%	1	
变性	95 $^{\circ}$ C	15s	100%	42	
退火、延伸	62 $^{\circ}$ C	40s	100%		X

5. ABI7500 仪器结果分析时设置基线起始和终止循环数为自动或根据实际情况手动调整，FAM、NED、VIC Delta Rn 阈值建议设置为 0.1（或根据实际情况进行微调）。

【阳性判断值】

1. 阴阳性判断

1) 当 ACTB $C_t \leq 32$ 且有明显的扩增曲线时，可以进入结果判断，否则样本检测结果无效；

2) 当 ONECUT2 $\Delta Ct \leq 5.7$ 或 VIM Ct ≤ 38.6 , 且有明显的扩增曲线时, 即 ONECUT2、VIM 任意一个结果为阳性时, 判定为样本阳性, 提示患者尿路上皮癌可能, 建议医生结合临床综合判断;

3) 当 ONECUT2 $\Delta Ct > 5.7$ (或结果为 Undetermined) 且 VIM Ct > 38.6 (或结果为 Undetermined) 时, 即 ONECUT2、VIM 结果均为阴性时, 判定为样本阴性, 提示患者尿路上皮癌可能性小, 建议医生结合临床综合判断。

注: ONECUT2 ΔCt 为 ONECUT2 与内参基因 ACTB 的 Ct 值差值。为方便计算, 当 ONECUT2 Ct 值为 undetermined 时, 可将 ONECUT2 Ct 值赋值 42 后进行 ΔCt 计算。

2. 批检测结果有效性判断

本试剂盒亦包含阳性质控和阴性质控, 应在每批次检测中添加质控, 通过质控结果情况反应该批次检测结果的有效性。当阴性质控结果为阴性、阳性质控结果为阳性时, 批次检测结果有效, 否则批次检测结果无效。

【检验结果的解释】

1. 检测时推荐加入空白质控 (NTC) 样本, 当 NTC 结果 ACTB、ONECUT2、VIM Ct 均大于 40.9 或无扩增曲线时, 即可判定本次检测无污染, 可以继续结果判定。
2. 本试剂盒包含阳性质控和阴性质控, 当阳性质控结果为阳性、阴性质控结果为阴性时, 批次检测结果有效, 否则批次检测结果无效。
3. 本试剂盒亦包含内参基因 ACTB, 当样本内参基因 ACTB Ct ≤ 32 且有明显的扩增曲线时, 即可判定样本检测结果有效, 否则结果无效。
4. 在满足上述 1, 2, 3 条件时, 即可进行结果判定:

1) 当 ONECUT2 $\Delta Ct \leq 5.7$ 或 VIM Ct ≤ 38.6 , 且有明显的扩增曲线时, 即 ONECUT2、VIM 任意一个结果为阳性时, 判定为样本阳性, 提示患者尿路上皮癌可能, 建议医生结合临床综合判断;

2) 当 ONECUT2 $\Delta Ct > 5.7$ (或结果为 Undetermined) 且 VIM Ct > 38.6 (或结果为 Undetermined) 时, 即 ONECUT2、VIM 结果均为阴性时, 判定为样本阴性, 提示患者尿路上皮癌可能性较小, 建议结合临床综合判断。

【检验方法的局限性】

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床确诊的依据，应结合其他临床诊断结果进行判定。判断为阳性的患者，建议根据医生建议进一步检查以便确诊，判断为阴性的患者不排除患病的可能；判断为无效结果的样本，建议重新取样检测。

【产品性能指标】

1. 产品性能指标：

- 1) 外观检查：试剂盒应组分齐全，包装完整，液体无泄漏；包装标签应清晰，内容完整，无破损；所有组分融化后应为澄清液体，无沉淀。
- 2) 阴性符合率：检测 6 份阴性参考品（N1-N6），阴性符合率为 100%。检测经临床参考标准诊断为泌尿系良性疾病的若干临床样本，检测结果均为阴性。
- 3) 阳性符合率：检测 6 份阳性参考品（P1-P6），阳性符合率为 100%。检测经组织病理诊断为尿路上皮癌的若干临床样本，检测结果均为阳性。
- 4) 最低检出限：使用临床阴性尿液样本为背景基质，对临床尿路上皮癌患者尿液样本进行不同梯度稀释，进行最低检出限研究，结果表明，可检出 50ng 基因组 DNA 背景下含有 0.12%ONECUT2/VIM 双基因甲基化的样本，含有 0.18% ONECUT2 单基因甲基化的样本。检测检测限参考品（L）5 次，两个基因的 Ct 值均不大于 40.9。
- 5) 精密度：检测若干样本(包括阴性、单基因阳性、双基因阳性) 对产品的重复性、中间精密度和再现性进行研究。每次检测每个样本重复 10 次，对批内、日间（20 天）、不同批号间、不同仪器间、不同操作者间以及不同实验室间的精密度分别进行评估，临床样本的阴性符合率和阳性符合率均为 100%，各基因的 Ct 值的变异系数均符合 $CV \leq 5\%$ 。检测 2 份精密度参考品（J1-J2）各 10 次，精密度参考品 J1 检测结果应均为阴性，精密度参考品 J2 检测结果应均为阳性。计算精密度参考品 J1 检测 10 次获得的 ACTB 基因扩增 Ct 值的变异系数(CV)应 $\leq 5\%$ ，计算精密度参考品 J2 检测 10 次获得的 ACTB、ONECUT2、VIM 各基因扩增 Ct 值的变异系数（CV）均应 $\leq 5\%$ 。

6) 分析特异性: 检测非尿路上皮癌的其他泌尿系统恶性肿瘤(前列腺癌、肾癌、膀胱神经内分泌肿瘤)临床样本, 均未发生交叉反应; 检测泌尿系统良性疾 病样本, 均未发生交叉反应; 检测其他系统常见恶性肿瘤(肠癌、肝癌、黑色素 瘤、卵巢癌、肺癌)临床样本, 均未发生交叉反应; 对尿路上皮癌及泌尿系良 性疾病样本中含有或不含有血尿进行对比分析, 表明血尿对检测没有影响; 检 测内源性及外源性干扰物质, 表明吉西他滨(2mg/mL)、吡柔比星(0.1mg/mL)、 丝裂霉素 C(0.1mg/mL)、白色念珠菌(2.5×10^{10} CFU/mL)、大肠杆菌(2.5×10^{10} CFU/mL)、氯化钠(7.3mg/mL)、金黄色葡萄球菌(2.5×10^{10} CFU/mL)、人血 清白蛋白(10mg/mL)、抗坏血酸(50mg/mL)、非结合型胆红素(2mg/mL)、 酒精(1% (V/V))、血红蛋白(100mg/mL)共 12 种干扰物质在相应的浓度下 对检测结果无影响。

2. 临床试验

在 4 家临床试验机构完成临床试验, 临床研究共纳入统计样本 1172 例, 以临 床参考标准作为对比方法, 临床试验结果显示: 本产品的临床灵敏度为 89.74%, 临床特异度为 92.46%, 临床准确度为 91.47%。

【注意事项】

1. 仅用于体外辅助诊断。请在使用前仔细阅读此说明书。
2. 本试剂盒检测结果受样本来源、样本质量、样本运输条件、反复冻融等因素 的影响, 所以需要严格控制样本质量。同时由于 DNA 提取质量不同与操作环境不同 等因素的限制, 可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果, 使用者应了解检测过程 中可能存在的潜在错误、准确性等局限性。
3. 实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》执行, 实 验人员必须通过专业培训, 实验过程应分区进行(试剂准备区、样本制备区、扩增区 和产物分析区), 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段实验用品 不能交叉使用。
4. 实验室各区间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。

实验用消耗品（如离心管、吸头等）应无 DNase 及 RNase 污染，灭菌后一次性使用，避免 DNase 及 RNase 污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。

5. 实验过程中穿工作服，戴一次性手套和口罩，使用自卸管的移液器，标本制备所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。

6. 实验开始前，工作台及移液器应使用 10% 次氯酸钠消毒十分钟，再使用 75% 酒精消毒。

7. 所有检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜，操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

8. 本产品只能与适配的定量 PCR 仪器型号配套使用，使用前应对仪器进行校准并确保仪器能够正常工作。

9. 产品使用者应对每次实验进行质量控制。

10. 96 孔板加样、封口膜封口后，需使用压膜器加固密封所有板膜结合的位置，做好防泄漏措施，避免污染仪器。

11. 扩增液 B1、B3 均含有光敏物质，操作及保存需注意避光。

【参考文献】

[1] Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E (2010) Cancer statistics, 2010. CA Cancer J. Clin. 60: 277-300.

[2] 黄健主编, 中国泌尿外科和男科疾病诊断治疗指南: 2019 版; 北京; 科学出版社, 2020.10

[3] 中国医师协会泌尿外科医师分会肿瘤专业委员会, 中国医师协会泌尿外科医师分会上尿路尿路上皮癌(CUDA-UTUC)协作组. 上尿路尿路上皮癌诊断与治疗中国专家共识[J]. 中华泌尿外科杂志 2018, 39(7): 485-488.

[4] Rouprêt M, Babjuk M, Compérat E, et al. European Association of Urology Guidelines on Upper Urinary Tract Urothelial Carcinoma: 2017 Update. Eur Urol. 2018; 73(1): 111-122.

[5] Black PC, Brown GA, DinneyCP. Molecular markers of urothelial cancer and their use in the monitoring of superficial urothelial cancer. J Clin Oncol 2006;24:5528-5535.

【基本信息】

注册人/生产企业：广州市基准医疗有限责任公司

售后服务单位：

住所：广州市国际生物岛螺旋三路8号502单元

生产地址：广州市国际生物岛螺旋三路8号401、501、502、602单元

电话：

网址：

医疗器械生产许可证编号：

【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】