

受理号：CSZ2000297

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 Twist1 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：安徽达健医学科技有限公司

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	7
三、临床评价概述	12
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

安徽达健医学科技有限公司

二、申请人住所

芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房（中科芜湖科技园公司内）

三、生产地址

芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房（中科芜湖科技园公司内）

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

试剂盒 I: 亚硫酸氢盐转化试剂盒 (离心柱型)

组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
1.转化液	亚硫酸氢钠	2 管	5 管
2.缓冲液	NaOH	520 μ L	1.3mL
3.结合液	异硫氰酸胍	8mL	20mL
4.漂洗液	纯化水	2.4mL	6mL
5.脱磺液	NaOH	4mL	10mL
6.洗脱液	Tris-HCl、EDTA	600 μ L	1.5mL
7.吸附柱	硅胶膜	20 个	50 个
8.收集管	/	20 个	50 个

试剂盒 II: PCR 扩增试剂盒

试剂组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份

1. PCR MIX	dNTP、10×PCR 缓冲液、 DNA 聚合酶	200μL	500μL
2. 引物探针 混合液	目的基因及内标基因 (GAPDH)的引物和探针	100μL	250μL
3. 阴性对照 品	白细胞 DNA 和 1×TE 缓冲 液	60μL	100μL
4. 阳性对照 品	膀胱癌组织 DNA 和 1×TE 缓冲液	60μL	100μL

注：不同批号的试剂盒中各组分不可以互换使用。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尿脱落细胞中膀胱癌相关 Twist1 基因甲基化状态。

本产品用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

膀胱癌是世界上常见的恶性肿瘤之一，也是引起泌尿系统肿瘤患者死亡的第二大肿瘤，早期发现膀胱癌可以增加手术保留膀胱的机会并提高患者总体生存率。研究发现可以在膀胱癌组织和患者尿液中检测到膀胱癌相关 Twist1 基因存在过度甲基化，检测 Twist1 基因甲基化状态可以用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

本试剂盒采用甲基化特异性实时荧光 PCR 法检测尿脱落细胞中膀胱癌相关 Twist1 基因的甲基化状态，是一种初诊膀胱癌辅助诊断方法。本试剂盒适用于血尿、尿频、尿急和尿痛等临床上疑似膀胱癌、临床诊断建议进行膀胱镜检查患者的辅助诊断。本产品仅作为现有诊断方法的补充和辅助，供临床医师参考。

(三) 产品包装规格

20 人份/盒、50 人份/盒

(四) 产品检验原理

本产品包括两个步骤：

步骤I，用试剂盒I将提取的基因组DNA进行亚硫酸氢盐转化，未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。

步骤II，将亚硫酸氢盐转化的DNA(Bis-DNA)做PCR扩增，试剂中含有膀胱癌相关 Twist1 基因甲基化特异性引物探针和内标基因(GAPDH)引物探针。甲基化特异性引物探针能与膀胱癌相关甲基化 Twist1 基因序列特异性结合，可以在PCR反应中特异地检测出甲基化序列。同时，内标基因(GAPDH)可监控每个样本的提取及PCR反应管的扩增情况，从而避免假阴性或部分抑制结果的发生。另外，试剂盒还提供了阳性对照品和阴性对照品，需在每一次检测中同时加入。

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、亚硫酸氢盐、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、亚硫酸氢盐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出限参考品。

企业参考品包括 Twist1 基因相应位点甲基化阳性的样本，这些样本 Twist1 基因的甲基化状态均经过数字 PCR 方法验证。

阳性参考品包括 3 种，分别命名为阳性参考品 P1-P3，为一定 DNA 浓度下 Twist1 基因不同甲基化比例的样本。

阴性参考品包括 4 种，分别命名为阴性参考品 N1-N4，其中 N1 为一定浓度下含有低于检出限的甲基化 Twist1 基

因样本，N2-N4 为一定浓度下分别含有其它不同肿瘤相关的基因甲基化的样本。

精密度参考品包括 3 种，分别命名为 J1-J3，其中 J1 为非膀胱癌患者样本，J2 和 J3 为一定 DNA 浓度下 Twist1 基因不同甲基化比例的样本。

检出限参考品包括 3 种，分别命名为 L1-L3，为一定低甲基化比例下不同浓度的样本。

本试剂盒同时设置了阳性对照和阴性对照，用于检测过程中的试剂和仪器的质量控制。此外，每个样本均检测内参基因 GAPDH，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、DNA 聚合酶用量的确定、PCR 缓冲液用量的确定、镁离子浓度的确定、dNTP 浓度的确定、PCR 反应体积的确定、PCR 模板体积的确定、转化液用量的确定、缓冲液浓度的确定、结合液浓度的确定、脱碘液浓度的确定等；对 PCR 反应条件的研究包括退火温度及时间、预变性温度及时间、变性时间、循环数等。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准确度、精密度、检出限、分析特异性、企业参考品的符合性、不同规格性能研究、亚硫酸氢盐转化效率等研究。

准确度研究中，申请人选择了若干临床尿液样本对试剂盒的检测准确性进行研究，研究结果显示试剂盒检测结果与测序结果阳性符合率为 100%、阴性符合率为 96.67%。

精密度研究中，申请人使用精密度参考品，分别用三批次试剂盒由两位操作者在 20 天进行连续的检测。结果显示试剂盒对精密度参考品的批内、日间、批间、仪器、人员和地点间的检测变异系数均小于等于 5%。

检出限研究中，以阴性尿液样本为基质，采用不同浓度、不同甲基化比例的模拟样本，每个浓度梯度的样本检测 20 次进行检出限的确认。使用连续生产的三个批次的试剂盒，用多例真实临床样本在检出限浓度水平上进行检出限的验证。明确了试剂盒的检出限为 5ng/uL 的野生型 DNA 背景下，5% 的 Twist1 甲基化 DNA。

分析特异性研究包含交叉反应和干扰研究，交叉反应研究包括其它基因甲基化的样本、转化前尿液样本、常见尿道微生物样本，均无交叉反应；用三批试剂盒检测其它恶性肿瘤患者尿液样本，包括肝癌、胃癌、肾细胞癌、前列腺癌，结果显示均无交叉反应。在上尿路肿瘤特异性研究中，检测

结果显示试剂盒对上尿路肿瘤（输尿管癌、肾盂癌）有一定的阳性检出率，试剂盒检测结果与测序结果完全一致。

干扰试验结果显示，尿液中分别含有以下干扰物：尿酸（ 1.4mmol/L ）、葡萄糖（ 55mmol/L ）、抗坏血酸（ $170\mu\text{mol/L}$ ）、白蛋白（ 60g/L ）、酮体（ 12mmol/L ）、尿胆原（ $10.65\mu\text{mol/L}$ ）、亚硝酸盐（ 120mg/L ）、pH 为 8.0、氨（ $107\mu\text{mol/L}$ ）、甘油三酯（ 37mmol/L ）、血红素（ 2g/L ）、维生素 C（ $170\mu\text{mol/L}$ ），常用药物如盐酸左氧氟沙星（ 1.08g/L ）、四环素（ 780mg/L ）、青霉素（ 27g/L ）、头孢克肟（ 426.6mg/L ）、布洛芬胶囊（ 478.8mg/L ）、感冒灵胶囊（ 9g/L ）对检测结果无影响。膀胱癌常用灌注治疗药物卡介苗（ 360mg/L ）、丝裂霉素（ 120mg/L ），表柔比星（ 150mg/L ）会影响检测的敏感性，因此接受化疗药物治疗后 1 个月内勿留样检测。

企业参考品的符合性研究中，申请人分别使用三批试剂盒对阳性参考品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性符合率、阴性符合率均为 100%。

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）阳性判断值或参考区间研究

本产品阳性判断值的研究采用真实尿液样本。阳性判断值研究入组（包括建立和验证）有效样本数共计 164 例，样

本来源包括膀胱癌患者、肾细胞癌患者、前列腺癌患者、输尿管癌患者、肾盂癌患者、输尿管炎、尿路上皮增生、膀胱无病变人群等。

采用百分位数法确定内标基因的 Ct 值的范围，内标基因 Ct 值 ≤ 25 时判定样本合格。采用 ROC 曲线法和约登指数确定试剂盒阳性判断值为 10。当 ΔCt 值 ≤ 10 时判断为阳性， ΔCt 值 > 10 时判断为阴性。

(五) 稳定性研究

申请人对该产品的稳定性研究包括货架效期稳定性、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 及尿液提取转化后 DNA 的稳定性）。

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、2、4、6、8 个月，每到一个时间节点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果显示试剂盒在生产后保存至 8 个月各项性能指标均符合产品技术要求，产品有效期可达 6 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

本产品在中山大学肿瘤防治中心、哈尔滨医科大学附属肿瘤医院、蚌埠医学院第一附属医院三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，膀胱癌和其它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。入组病例为膀胱癌的疑似病例，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 1233 例，其中膀胱癌病例 348 例（覆盖膀胱癌所有分期及病理分型），非膀胱癌的其他病例 885 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 88.2%（95%CI：84.4% - 91.2%），特异度为 86.8%（95%CI：84.4% - 88.9%），总符合率为 87.2%（95%CI：85.2% - 88.9%）。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 254 例膀胱癌疑似病例，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：阳性符合率为 100%（95%CI：93.2% - 100%），阴性符合率为 99%（95%CI：96.5% - 99.7%），总符合率为 99.2%（95%CI：97.2% - 99.8%）。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。

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 Twist1 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

该产品适用于临床上疑似膀胱癌、临床诊断建议进行膀胱镜检查患者的辅助诊断，不能作为膀胱癌早期诊断或确诊的依据，检查结果仅供临床参考，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判断。其临床应用的主要受益在于：该产品为临床上疑似膀胱癌、临床建议进行膀胱镜检查的患者提供了一种膀胱癌辅助诊断方法的选择，检查结果为阳性的患者体内有膀胱癌的可能性大，从而促进这部分人群顺应膀胱镜检查，获得及时的诊断和治疗。依据现有的临床试验结果，其对膀胱癌的检查灵敏度为 88.2%，特异度为 86.8%。

（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膀胱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，例如使用非推荐的提取试剂或荧光定量 PCR 仪。

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处理。

通过对人 Twist1 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法) 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尿脱落细胞中 Twist1 基因甲基化。

本产品用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

该产品适用于临床上疑似膀胱癌、临床诊断建议进行膀胱镜检查患者的辅助诊断，不能作为膀胱癌早期诊断或确诊的依据。检查结果仅供临床参考，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判断。阳性结果需要进一步接受膀胱镜检查；阴性结果表示受检者体内有膀胱癌的可能性低，但并不能完全排除疾病风险，必要时仍建议进行膀胱镜检查。本产品不能替代膀胱镜，不能用于普通人群的膀胱癌筛查。

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，属于境内同品种首个产品。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）、《体外诊断试剂注册管理办法》（原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。

2022 年 9 月 28 日

附件：产品说明书

人 Twist1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：人 Twist1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 20 人份/盒、50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测尿脱落细胞中膀胱癌相关 Twist1 基因甲基化状态。

本产品用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

膀胱癌是世界上常见的恶性肿瘤之一，也是引起泌尿系统肿瘤患者死亡的第二大肿瘤，早期发现膀胱癌可以增加手术保留膀胱的机会并提高患者总体生存率。研究发现可以在膀胱癌组织和患者尿液中检测到膀胱癌相关 Twist1 基因存在过度甲基化，检测 Twist1 基因甲基化状态可以用于初诊膀胱癌的辅助诊断。

本试剂盒采用甲基化特异性实时荧光 PCR 法检测尿脱落细胞中膀胱癌相关 Twist1 基因的甲基化状态，是一种初诊膀胱癌辅助诊断方法。本试剂盒适用于血尿、尿频、尿急和尿痛等临床上疑似膀胱癌、临床诊断建议进行膀胱镜检查患者的辅助诊断。本产品仅作为现有诊断方法的补充和辅助，供临床医师参考。

【检验原理】

本产品包括两个步骤：

步骤I，用试剂盒I将提取的基因组DNA进行亚硫酸氢盐转化，未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。

步骤II，将亚硫酸氢盐转化的DNA（Bis-DNA）做PCR扩增，试剂中含有膀胱癌相关Twist1基因甲基化特异性引物探针和内标基因（GAPDH）引物探针。甲基化特异性引物探针能与甲基化膀胱癌相关Twist1基因序列特异性结合，可以在PCR反应中特异地检测出甲基化序列。同时，内标基因（GAPDH）可监控每个样本的提取及PCR反应管的扩增情况，从而避免假阴性或部分抑制结果的发生。另外，试剂盒还提供了阳性对照品和阴性对照品，需在每一次检测中同时加入。

【主要组成成分】

试剂盒 I：亚硫酸氢盐转化试剂盒（离心柱型）

组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
1.转化液	亚硫酸氢钠	2 管	5 管
2.缓冲液	NaOH	520μL	1.3mL
3.结合液	异硫氰酸胍	8mL	20mL
4.漂洗液	纯化水	2.4mL	6mL
5.脱磺液	NaOH	4mL	10mL
6.洗脱液	Tris-HCl、EDTA	600μL	1.5mL
7.吸附柱	硅胶膜	20 个	50 个
8.收集管	/	20 个	50 个

试剂盒 II：PCR 扩增试剂盒

试剂组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
5. PCR MIX	dNTP、10×PCR 缓冲液、DNA 聚合酶	200μL	500μL
6. 引物探针混合液	目的基因及内标基因(GAPDH)的引物和探针	100μL	250μL
7. 阴性对照品	白细胞 DNA 和 1×TE 缓冲液	60μL	100μL
8. 阳性对照品	膀胱癌组织 DNA 和 1×TE 缓冲液	60μL	100μL

注：不同批号的试剂盒中各组分不可以互换使用

其它需要自备的试剂及耗材如下：

- 核酸提取或纯化试剂（通用型）：备案号皖芜械备 20190002、货号 GE50 或 GE100；
- 无水乙醇（分析纯，浓度高于 99.5%）、异丙醇；
- 1.5mL、2mL 收集管；带滤芯枪头，包括 100μL、200μL、1mL；八联管或 96 孔板。

【储存条件及有效期】

1. 本试剂盒 I 常温储存；试剂盒 II 置于 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存，有效期为 6 个月。
2. 开封后 24 小时内可在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 储存，避免反复冻融 5 次以上。
3. 试剂盒 I 常温运输，试剂盒 II 采用泡沫箱加干冰密封运输、运输时间不超过 4 天、开箱温度不高于 -15°C 。

【适用仪器】

有 FAM 和 CY5 荧光通道的荧光定量 PCR 仪：ABI 7500。

【样本要求】

尿脱落细胞的采集和存储：

留取尿样于尿样本采集管内，尿量体积为 100-200mL。尿样采集后常温下保存不超过 24 小时， $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 48 小时，可离心制备尿细胞沉渣。细胞沉渣 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 可以保存一个月； -70°C 及以下可以保存 12 个月。

【检验方法】

1. 核酸提取

使用安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（通用型）（医疗器械备案凭证编号：皖芜械备 20190002），操作流程见试剂盒说明书，操作步骤摘要如下：

- 1.1 取 15 μL 阴性对照品、阳性对照品及尿细胞沉渣，分别加入 500 μL 裂解液（如有沉淀 50°C 水浴溶解），30 μL 蛋白酶 K，充分混匀后 70°C 裂解 40min。
- 1.2 短暂离心，加入 200 μL 异丙醇，充分混匀。
- 1.3 短暂离心，将 1.2 液体全部加入吸附柱中，12000rpm 离心 1min，弃废液。
- 1.4 向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液 I 一次，12000rpm 离心 30s，弃废液。
- 1.5 向吸附柱中加入 600 μL 漂洗液 II 进行两次洗脱，12000rpm 离心 30s，弃废液。
- 1.6 向吸附柱中加入洗脱液 50-100 μL ，室温静置 3min，然后 12000rpm 离心 2min，收集 DNA。

注：提取的核酸不适合用核酸微量测定仪的结果及 OD260/OD280 来判定核酸质量，尿脱落细胞 DNA 样本于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存不超过 30 天。

2. 工作液的制备（在试剂准备区进行）

2.1 20 测试漂洗液的制备

将 9.6mL 无水乙醇加入到漂洗液瓶中，旋紧瓶盖，上下颠倒 5 次，彻底混匀。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“√”。

2.2 50 测试漂洗液的制备

将 24mL 无水乙醇加入到漂洗液瓶中，旋紧瓶盖，上下颠倒 5 次，彻底混匀。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“√”。

2.3 转化液的配制

首先将转化液离心 30s，然后添加 750μL 纯化水和 210μL 缓冲液到转化液中，室温下涡旋振荡 10min，使其充分溶解。制备好的转化液对光很敏感，所以尽量减少在光下的暴露，一管转化液为 10 测试用量，转化液应当在制备后立刻使用，-20±5℃条件下不超过 7 天。冷冻保存后的转化液，使用前常温下充分溶解振荡离心后使用。

3. 亚硫酸氢盐转化（在样本处理区进行）

3.1 预先打开金属浴，37℃恒温。

3.2 各取 45μL 提取后的阳性对照品、阴性对照品、45μL 待测尿液 DNA 样本（若提取的 DNA 样本浓度高于 45ng/μL，用纯化水稀释至 45ng/μL，使 DNA 总投入量为 2μg；低于 45ng/μL 样本取 45μL 参与转化）于新的 1.5mL 离心管中。

3.3 每管加入 5μL 缓冲液于步骤 3.2 中的 1.5mL 离心管中，配置成 50μL 体系涡旋混匀样本，短暂离心。

3.4 将 3.3 步骤样本置于金属浴 37℃恒温孵育 15min。

3.5 孵育完成后，向每个样本中加入 100μL 预先制备的转化液，混匀并短暂离心。

3.6 将 3.5 步骤样本置于金属浴，50℃避光孵育 12~16 小时。

3.7 样本置于冰上（0~4℃）孵育 10min。

3.8 将吸附柱置于收集管中，向吸附柱中加入 400μL 结合液。

3.9 将步骤 3.7 中的样本加入吸附柱中（含有结合液），盖紧管盖上下颠倒混匀数次。

3.10 全速离心 30s，弃废液。

3.11 向吸附柱中加入 100 μ L 漂洗液，全速离心 30s，弃废液。

3.12 向吸附柱中加入 200 μ L 脱碘液，室温（20℃~30℃）孵育 15~20min，之后全速离心 30s，弃废液。

3.13 向吸附柱中加入 200 μ L 漂洗液，全速离心 30s。重复加入 200 μ L 漂洗液，全速离心 1min，弃废液及收集管。

3.14 将吸附柱放入 1.5mL 无菌离心管中，向吸附柱的膜中间部位悬空滴加 20 μ L 洗脱液，洗脱转化 DNA，全速离心 1min，收集 Bis-DNA。

注：获取的 Bis-DNA 应立即用于后续实验，或者-20 $\pm$ 5℃保存不超过 3 天。

4. PCR 设置

4.1 PCR 扩增试剂准备（在试剂准备区进行）

- 从冰箱中取出试剂盒，室温下解冻。待完全融化，充分混匀后离心备用。
- 按照下列表格配置 PCR 反应液（每次反应需要设置阳性对照品和阴性对照品）。

试剂成分	用量/人份 (μ L)
PCR MIX	10
引物探针混合液	5
总量/测试	15

- PCR 反应液充分混匀后，以每管 15 μ L 分装于 PCR 八联管（八联管做好标记），转移至样本处理区。剩余试剂放回-20 $\pm$ 5℃保存。

4.2 加样（在样本处理区进行）

- 取 5 μ L 阳性对照品、阴性对照品以及待检样本的 Bis-DNA，分别加入到分装好的 PCR 八联管中。八联管盖紧管盖，短暂离心，将管壁液体离心至管底。

5. PCR 扩增（在 PCR 扩增检测区进行）

- 将PCR八联管放置在仪器样本槽相应位置，并记录摆放顺序。
- 仪器检测通道选择：Reporter Dye1（Twist1 基因）：FAM，Quencher Dye1：none；Reporter Dye2(GAPDH 基因)：CY5，Quencher Dye2：none；Passive Reference：none。
- 对应检测孔的设定：在扩增反应开始前，将待检样本和对照品设定为

“Unknown”。

- 设置 PCR 反应条件

荧光程序	温度 (°C)	时间	循环数	荧光信号收集
第一步	95	5 min	1	否
第二步	95	15 s	20	否
	64	30 s		否
第三步	95	10 s	35	否
	61	31 s		是

【阳性判断值】

Twist1	ΔCt	样本检测结果
$Ct \leq 20$	$\Delta Ct \leq 10$	阳性
	$\Delta Ct > 10$	阴性
$Ct > 20$	/	阴性

本产品阳性判断值的研究采用临床来源尿液样本。阳性判断值研究入组（包括建立和验证）有效样本数共计 164 例，样本来源包括膀胱癌患者、肾细胞癌患者、前列腺癌患者、输尿管癌患者、肾盂癌患者、输尿管炎、尿路上皮增生、膀胱无病变人群等。

采用百分位数法确定内标基因的 Ct 值的范围，内标基因 Ct 值 ≤ 25 时判定样本合格。采用 ROC 曲线法和约登指数确定试剂盒阳性判断值为 10。当 ΔCt 值 ≤ 10 时判断为阳性， ΔCt 值 > 10 时判断为阴性。

注： ΔCt 值（目的基因 Ct 值-内标基因 Ct 值）

【检测结果的解释】

1. 阈值设定

可按仪器自动输出，也可根据仪器的使用说明手动调整基线，将阈值设定在荧光值对数图的线性部分，从软件中导出数据并读取 Ct 值，若基因无扩增时，Ct 值定义为 35。

2. 试剂盒有效性判定

- 阴性对照品：FAM通道检测不应有曲线升起，CY5通道检测有扩增且Ct值 ≤ 25 。
- 阳性对照品：FAM 单独有扩增，或者 FAM 和 CY5 通道检测均有扩增（呈典型的 S 型曲线）且 Ct 值 ≤ 25 。

★同时符合以上两个条件，此次检测视为有效。

3. 样本有效性判定

若内标基因检测（CY5 通道）有扩增且 Ct 值 ≤ 25 ，则可继续分析；若内标基因检测（CY5 通道）Ct 值 > 25 或无扩增，但目的基因（FAM 通道）有扩增且 Ct 值 ≤ 25 ，则可继续分析；若内标基因检测（CY5 通道）Ct 值 > 25 或无扩增，目的基因（FAM 通道）也无扩增或有扩增但 Ct 值 > 25 ，则无法继续分析，需重复检测。

4. 甲基化检测结果的判定

- 4.1 若样本目的基因 Twist1 基因（FAM 通道）有扩增(呈典型的 S 型曲线)，Ct 值 ≤ 20 ，且 ΔCt 值（目的基因 Ct 值-内标基因 Ct 值） ≤ 10 ，则判定该样本 Twist1 基因检测结果为阳性；若 ΔCt 值 > 10 ，则判定该样本 Twist1 基因检测结果为阴性。
- 4.2 若样本目的基因 Twist1 基因（FAM 通道）有扩增(呈典型的 S 型曲线)，Ct 值 > 20 ， ΔCt 值（目的基因 Ct 值-内标基因 Ct 值）不论大小，均判定该样本 Twist1 基因检测结果为阴性。
- 4.3 若内标基因检测（CY5 通道）Ct 值 > 25 或无扩增，目的基因（FAM 通道）也无扩增或有扩增但 Ct 值 > 25 ，需重复检测。重复检测判读标准同 4.1 和 4.2 项。若重复检测内标基因检测（CY5 通道）Ct 值 > 25 或无扩增，需要重新采集样本检测。

【检测方法的局限性】

1. 两个试剂盒需联合使用，以确保检测有效性。
2. 由于膀胱癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响，样本的采集、制备和存储均应按照要求进行，否则将影响检查结果，导致假阴性的检测结果。

3. 本检测试剂盒检测结果仅供临床参考，不作为确诊膀胱癌的诊断证据，任何受检样本 Twist1 基因检测呈阳性的患者还应接受膀胱镜的进一步检查确诊。
4. 由于上尿路肿瘤与膀胱癌的组织同源性强，试剂盒临床试验对上尿路肿瘤（肾盂癌和输尿管癌）有一定的检出率（50.9%），本产品检测结果为阳性且通过膀胱镜检查显示膀胱无病变的受检者，建议通过其它临床检查手段排查上尿路肿瘤。

【产品性能指标】

1. 产品性能指标

1.1 阳性符合率

检测 3 份企业阳性参考品，结果均为阳性。

1.2 阴性符合率

检测 4 份企业阴性参考品，结果均为阴性。

1.3 最低检出限

1.3.1 检测 3 份企业检出限参考品，检出限参考品应能检出。

1.3.2 使用临床阴性尿液样本为背景基质，对临床膀胱癌患者尿液样本进行不同梯度稀释，进行最低检出限研究，结果表明本试剂盒最低可以检出核酸浓度为 5ng/μL、甲基化比例为 5% 的临床阳性样本。

1.4 精密度

1.4.1 检测 1 份企业阴性精密度参考品，10 次重复，结果全部为阴性。

1.4.2 检测 1 份企业弱阳性精密度参考品，10 次重复，结果全部为阳性。

1.4.3 检测 1 份企业中阳性精密度参考品，10 次重复，结果全部为阳性，计算所测得 Twist1 基因 Ct 值的变异系数（CV），均不高于 5%。

1.4.4 使用精密度参考品分别对三批试剂盒在 ABI7500 荧光 PCR 仪上由两位实验人员在不同的实验室进行连续 20 天的检测，结果显示在日内、日间、人员间、设备间、实验室间和批间实验结果均符合要求，且中阳性参考品 Twist1 基因 Ct 值的变异系数（CV）小于 5%。

2. 其它干扰

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：尿酸（1.4mmol/L）、葡萄糖（55mmol/L）、抗坏血酸（170μmol/L）、白蛋白（60g/L）、酮体

(12mmol/L)、尿胆原(10.65 μ mol/L)、亚硝酸盐(120mg/L)、pH 为 8.0、氨(107 μ mol/L)、甘油三酯(37mmol/L)、血红素(2g/L)、维生素 C(170 μ mol/L, 常用药物如盐酸左氧氟沙星(1.08g/L)、四环素(780mg/L)、青霉素(27g/L)、头孢克肟(426.6mg/L)、布洛芬胶囊(478.8mg/L)、感冒灵胶囊(9g/L)对检测结果无影响。膀胱癌常用灌注治疗药物卡介苗(360mg/L)、丝裂霉素(120 mg/L), 表柔比星(150mg/L)会影响检测的敏感性, 因此接受化疗药物治疗后 1 个月内勿留样检测。

3. 交叉反应

试剂盒检测转化前的尿液样本、非目标的其它基因甲基阳性的尿液样本、常见尿道微生物样本及尿道相关良性病变, 均无交叉反应; 试剂盒检测其它恶性肿瘤患者尿液样本(肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胃癌、输尿管癌、肾盂癌), 结果显示: 该产品与输尿管癌和肾盂癌存在一定的交叉反应, 与其它恶性肿瘤无交叉反应。

4. 准确性

选择 138 例样本进行准确性研究, 得出阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 96.67%, 符合率为 97.83%。根据临床疾病的类型分为膀胱癌组、正常人组、干扰组和上尿路肿瘤组, 一致性分别为: 97.30%、100%、96.08%和 100%。

5. 临床有效性

通过三家临床机构共纳入 1233 例临床有效样本的验证, 本试剂盒对膀胱癌检测的灵敏度为 88.2%、特异性为 86.8%, 总符合率为 87.2%。

【注意事项】

1. 实验室注意事项

- (1) 应避免实验过程中的交叉污染, 包括 DNA 提取, 亚硫酸氢盐转化和 DNA 洗涤等过程。
- (2) 为防止在 DNA 提取过程中核酸酶混入样本, 建议使用一次性的移液管和枪头, 这样可以避免不同样本间的交叉污染。检测实验应该由精通 DNA 提取和荧光定量 PCR 分析的专业实验人员完成。
- (3) 为防止 PCR 扩增产物的污染, 建议严格区分 PCR 步骤, 分为 DNA 的提取及转化、PCR 试剂的配置和荧光定量 PCR 扩增。

2. 微生物及感染状态

为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和黏膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【参考文献】

1. 国家药品监督管理局.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》（2014 年第 17 号公告）
2. Miremam J, Kyprianou N. The Promise of Novel Molecular Markers in Bladder Cancer. *International Journal of Molecular Sciences*. 2014; 15(12):23897-23908
3. Yafi FA, Brimo F, Steinberg J, Aprikian AG, Tanguay S, Kassouf W. Prospective analysis of sensitivity and specificity of urinary cytology and other urinary biomarkers for bladder cancer. *Urol Oncol*. 2015 Feb;33(2):66.e25-31.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：安徽达健医学科技有限公司

住所/生产地址：芜湖经济技术开发区东区 9#厂房（中科芜湖科技园公司内）

联系方式：

售后服务单位名称：

E-maiL:

网址:

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】

