

受理号：CSZ1900359

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、
ZNF671 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：上海捷诺生物科技有限公司

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.....	5
三、临床评价概述.....	10
四、产品受益风险判定.....	11
综合评价意见.....	15

基本信息

一、 申请人名称

上海捷诺生物科技有限公司

二、 申请人住所

上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 1 层

三、 生产地址

上海市徐汇区银都路 466 号三号楼一楼，上海市徐汇区银都路 466 号一号楼二楼 201、203 室，上海市徐汇区龙吴路 2715 号一幢 104、106、108 室。

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

组分	主要成分	包装量
反应液	dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Eva Green 染料	1.1 mL/支×1
八联管	6 个基因和 Marker QC、Marker QM 引物	12 条/盒×1
八联管盖	/	12 条/包×1
反应水	超纯水	2 mL/支×1
阳性质控	亚硫酸氢盐转化后的 SiHa 细胞 DNA 和人基因组 DNA 的混合液	90 μL/支×1
裂解液	裂解液	500 μL/支×1

具体内容详见产品说明书。

(二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测人宫颈脱落细胞中 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因的甲基化状态。

本产品适用于 12 种高危 HPV (hrHPV) 基因型 (31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型) 检测阳性的 30 岁以上女性人群, 帮助识别是否需要进行阴道镜检查, 达到分流管理的目的。

hrHPV 持续感染是导致宫颈癌的主要病因, 但大多数感染是一过性且无临床症状, 能够通过自身免疫系统调节而清除, 仅有极少数 hrHPV 持续感染的患者可能会进展为宫颈癌前病变甚至宫颈癌。使用本产品检测, 当检测结果为阴性时, 提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低的可能性较大, 可避免阴道镜及组织活检检查, 做好定期复查; 检测结果为阳性时, 提示宫颈病变级别较高的可能性大, 需

进一步进行阴道镜和/或组织活检检查。该检测不能替代宫颈细胞学检查。

(三) 产品包装规格

10 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本产品包括三个步骤：细胞裂解、亚硫酸氢盐转化和实时荧光 PCR。

步骤 1，细胞裂解：使用试剂盒内的裂解液对宫颈脱落细胞进行裂解，释放基因组 DNA；

步骤 2，亚硫酸氢盐转化：细胞裂解后用亚硫酸氢盐进行转化处理，DNA 上未发生甲基化的胞嘧啶 C 因脱氨基反应变成尿嘧啶 U，而发生甲基化的胞嘧啶 C 则不会被亚硫酸氢盐转化；

步骤 3，实时荧光 PCR：以转化后的 DNA 为模板做荧光 PCR 扩增，特异性的引物只能扩增发生甲基化的基因，从而检测 6 个基因 ASTN1 (Marker1)、DLX1 (Marker2)、ITGA4 (Marker3)、RXFP3 (Marker4)、SOX17 (Marker5)、ZNF671 (Marker6) 的甲基化状态。

本产品同时设置了内部质控 Marker QC 和 Marker QM，Marker QC 用于评估样本 DNA 是否足量以及亚硫酸氢盐转化质量是否合格，Marker QM 用于评估女性样本的正常甲基化状态。

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：产品的主要原材料有引物、Taq DNA

聚合酶、dNTPs、Eva Green 染料、SiHa 细胞和裂解液。这些原材料均是通过外购的方式获得。

引物由申请人自行设计，由合成公司经过合成和纯化后获得；Taq DNA 聚合酶由原材料供应商重组表达纯化后获得；dNTPs 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，通过功能性实验筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品设置情况

该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、最低检出限参考品，组成如下：

阳性参考品包括 7 种，分别命名为阳性参考品 P1~P7，其中阳性参考品 P1~P3 为一定细胞量下不同甲基化比率的样本；阳性参考品 P4~P5 为不同浓度的 SiHa 细胞；阳性参考品 P6 为人宫颈鳞癌细胞样本；阳性参考品 P7 为人宫颈腺癌细胞样本。

阴性参考品包括 5 种，分别命名为阴性参考品 N1~N5，其中阴性参考品 N1 为 IL-17 基因甲基化的人宫颈脱落细胞；N2 为 STK31 基因甲基化的人宫颈脱落细胞；N3 为 DNMT1 基因甲基化的人宫颈脱落细胞；N4 为 IFFO1 基因甲基化的人宫颈脱落细胞；N5 为卵巢癌患者的宫颈脱落细胞。

精密度参考品包括 3 种，分别命名为精密度参考品 C1~C3，其中精密度参考品 C1 为中高甲基化比率的样本；精密度参考品 C2 为低甲基化比率样本；精密度参考品 C3 为 6 个标志物非甲基化的人

宫颈脱落细胞样本。

最低检出限参考品包括 6 种，分别命名为最低检出限参考品 S1~S6，为经过系列稀释后的 6 个不同甲基化比率的细胞样本。

本试剂盒设置了阳性质控和阴性质控，用于检测过程中试剂盒和仪器的质量控制。此外，每个样本均检测 2 个内部质控，用于结果的判读和评估样本的质量。

(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浓度的确定、PCR 反应液的选择、反应体积的确定、亚硫酸氢盐转化试剂盒的确定等；对 PCR 反应条件的研究包括两步法与三步法、退火温度和扩增循环数的优化；对样本的用量以及样本保存时间进行了研究；对基线和阈值的确定。

通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。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

该产品分析性能评估内容包括准确度、精密度、最低检出限、分析特异性、包容性、亚硫酸氢盐转化试剂盒研究。

准确度研究中，申请人分别使用三批次试剂盒对阳性参品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性参考品符合率、阴性参考品符合率均为 100%。同时使用若干临床样本对试剂盒准确性进行了研究，检测结果与临床金标准诊断方法学（病理学）结果进行比对，得出 CIN2+和 CIN3+的临床灵敏度分别是 83.05%和 89.47%，临床特

异性分别是 84.55%和 78.44%。

精密度研究通过不同地点、人员、轮次、日间和批次对中强阳性、弱阳性以及阴性样本进行连续 20 天精密度研究，本试剂盒检测结果的 Ct 值变异系数（CV）均不大于 5.0%。

最低检出限研究，以阴性宫颈脱落细胞样本为基质，对不同甲基化比率的模拟样本和临床阳性稀释样本进行检测，得到宫颈脱落细胞样本的检测限，6 个基因的最低检出限如下表：

基因名称	甲基化比率
ASTN1	0.4%
DLX1	2%
ITGA4	0.4%
RXFP3	0.4%
SOX17	4%
ZNF671	0.2%

分析特异性研究包含交叉反应和干扰研究，交叉反应研究结果表明试剂盒检测非目标的其他基因甲基化阳性的宫颈脱落细胞样本，均无交叉反应。

干扰实验研究结果显示，宫颈脱落细胞样本中含有以下干扰物质：500mg/dL 血红蛋白、 1×10^6 个/mL 白细胞、宫颈粘液、20mg/mL 替硝唑阴道片、174mg/mL 保妇康栓、100mg/mL 重组干扰素 $\alpha 2b$ 凝胶、润滑剂，对本试剂盒的检测结果无影响。

包容性研究，申请人对不同宫颈癌组织类型样本的适用性进行研究，对宫颈癌组织类型为鳞癌、腺癌、腺鳞癌样本研究结果表明，本试剂盒适用于不同宫颈癌组织类型。

申请人采用临床宫颈脱落细胞样本进行了亚硫酸氢盐转化试剂盒性能研究，并根据与本试剂盒的组合性能研究结果，确定推荐的

亚硫酸氢盐转化试剂盒符合检测要求。

(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临床来源的宫颈脱落细胞样本。636 例样本中 \leq CIN1 病例 503 例，CIN2 病例 85 例， \geq CIN3 病例 48 例。申请人使用本产品和一代测序分别检测上述样本中 6 个基因的甲基化情况，以一代测序结果为金标准，采用 ROC 曲线法确定每个基因 Δ Ct 值的阳性判断值。

以病理结果为金标准，采用逻辑回归分析方法确定模型中 6 个基因的权重，建立 6 个基因的评分，然后根据约登指数最大的原则确定最佳阈值，最终确定本试剂盒的阳性判断值为 3。当 6 个基因分值总和 < 3 时，样本检测结果为阴性；当 6 个基因分值总和 ≥ 3 时，样本检测结果为阳性。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、运输稳定性进行了研究，同时，对样本的稳定性也进行了研究。

实时稳定性：将三批次试剂盒置于 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存，在效期的第 0、8、10、12、14 个月各进行一次检测，试剂盒在生产后保存至 14 个月各项性能指标均符合产品技术要求，产品有效期可达 12 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性进行了研究。结果显示，产品的性能均满足产品说明书的声称。

样本稳定性：申请人对样本稳定性进行了研究，结果表明样本在室温下保存 4 周内，在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 12 周内进行检测。常温条件

下，样本运输时间不超过 3 天。

三、 临床评价概述

本产品在北京大学第一医院、南京大学医学院附属鼓楼医院、湖南省妇幼保健院和安徽医科大学第一附属医院共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，同时对比分析本产品与宫颈细胞学检查对 12 种 hrHPV 检测阳性人群进行分流的临床性能。所有病例采用阴道镜检查和/或组织病理学检查结果为临床参考标准。临床试验前瞻性入组 12 种 hrHPV 检测阳性病例 1112 例，30 岁以上适用人群受试者 746 例，其中阴道镜和/或组织病理学检查为阴性的病例 473 例，CIN1 病例 157 例，CIN2 病例 73 例， \geq CIN3 病例 43 例。临床试验结果显示：针对 30 岁以上 12 种 hrHPV 检测阳性的人群，以 CIN2 为临床诊断阈值，试验体外诊断试剂临床灵敏度为 86.21% (95%CI: 79.93%, 92.48%)，特异度为 93.97% (95% CI: 92.11%, 95.83%)，阳性预测值为 72.46% (95%CI: 65.01%, 79.92%)，阴性预测值为 97.37% (95%CI: 96.10%, 98.64%)，阳性似然比为 14.29 (95% CI: 10.41, 19.61)，阴性似然比为 0.14 (95%CI: 0.09, 0.23)。宫颈细胞学检查临床灵敏度为 83.62% (95%CI: 76.89%, 90.36%)，特异度为 54.92% (95% CI: 51.04%, 58.81%)，阳性预测值为 25.46% (95%CI: 21.09%, 29.83%)，阴性预测值为 94.79% (95%CI: 92.52%, 97.07%)，阳性似然比为 1.86 (95% CI: 1.65, 2.09)，阴性似然比为 0.30 (95%CI: 0.20, 0.45)。

以 CIN3 为临床诊断阈值，试验体外诊断试剂临床灵敏度为

95.35%(95%CI: 84.19%, 99.43%), 特异度为 86.20%(95%CI: 83.65%, 88.75%), 阳性预测值为 29.71%(95%CI: 22.09%, 37.33%), 阴性预测值为 99.67%(95%CI: 98.82%, 99.96%), 阳性似然比为 6.91(95%CI: 5.68, 8.41), 阴性似然比为 0.05(95%CI: 0.01, 0.21)。宫颈细胞学检查临床灵敏度为 86.05%(95%CI: 75.69%, 96.40%), 特异度为 51.07%(95%CI: 47.37%, 54.76%), 阳性预测值为 9.71%(95%CI: 6.74%, 12.68%), 阴性预测值为 98.36%(95%CI: 97.05%, 99.66%), 阳性似然比为 1.76(95%CI: 1.53, 2.03), 阴性似然比为 0.27(95%CI: 0.13, 0.58)。

试验结果显示, 试验体外诊断试剂用于 12 种 hrHPV 检测阳性患者分流时, 与宫颈细胞学检查相比, 在灵敏度基本一致的情况下, 特异度显著提高($P < 0.0001$), 可有效降低不必要的阴道镜转诊数量。

针对本产品检测的六个甲基化位点, 采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序法进行对比试验, 共入组临床样本 488 例, 试验结果显示, 针对每个甲基化位点, 两种检测方法总符合率均高于 90%, 一致性良好。不一致样本均为试验体外诊断试剂检测阳性, 而 Sanger 测序法阴性, 经二代测序法复核, 试验有效的样本复核结果均与试验体外诊断试剂一致。

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

(一)受益评估

hrHPV 持续感染是导致宫颈癌的主要病因, 但大多数感染是一

过性且无临床症状，能够通过自身免疫系统调节而清除，仅有极少数 hrHPV 持续感染的患者可能会进展为宫颈癌前病变甚至宫颈癌。

本产品体外定性检测人宫颈脱落细胞中 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因的甲基化状态，对 12 种高危 HPV 基因型检测阳性的 30 岁以上女性人群进行分流管理。其临床应用的主要受益在于：使用该产品检测，当检测结果为阴性时，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低的可能性大，可避免阴道镜及组织活检检查，做好定期复查；检测结果为阳性时，提示宫颈病变级别较高的可能性大，需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查。本产品帮助识别是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。依据现有临床试验结果，其对 CIN2+ 的检测灵敏度为 86.21%，特异度为 93.97%。该检测不能替代宫颈细胞学检查。

(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. 与预期用途有关的安全风险，例如样本检测结果阳性不能作为宫颈高级别病变及宫颈癌临床诊断的唯一依据，需结合其他的检查结果综合判断。
2. 与生产有关的安全风险，例如使用未经过验证或检验不合格的原材料。
3. 与运输与储存有关的安全风险，例如在不正确的储存和运输条件下储存、运输试剂盒。
4. 与使用有关的安全风险，例如使用仪器和试剂时没有按照说明书要求进行操作。

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医疗废弃物统一销毁处理。

通过对人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）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。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，但是为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在该试剂盒说明书中提示以下信息：

1. 预期用途：

本产品用于体外定性检测人宫颈脱落细胞中 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因的甲基化状态。本产品适用于 12 种高危 HPV（hrHPV）基因型（31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型）检测阳性的 30 岁以上女性人群，帮助识别是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

hrHPV 持续感染是导致宫颈癌的主要病因，但大多数感染是一过性且无临床症状，能够通过自身免疫系统调节而清除，仅有极少数 hrHPV 持续感染的患者可能会进展为宫颈癌前病变甚至宫颈癌。使用本产品检测，当检测结果为阴性时，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低的可能性大，可避免阴道镜及组织活检检查，做好定期

复查；检测结果为阳性时，提示宫颈病变级别较高的可能性大，需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查。该检测不能替代宫颈细胞学检查。

2. 警示及注意事项：

该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检验方法的局限性及注意事项。

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》（国务院令 第 680 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 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 8 月 3 日

附件：产品说明书

人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

说明书

【产品名称】

人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

10 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人宫颈脱落细胞中 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因的甲基化状态。

本产品适用于 12 种高危 HPV (hrHPV) 基因型 (31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 型) 检测阳性的 30 岁以上女性人群，帮助识别是否需要进行阴道镜检查，达到分流管理的目的。

hrHPV 持续感染是导致宫颈癌的主要病因，但大多数感染是一过性且无临床症状，能够通过自身免疫系统调节而清除，仅有极少数 hrHPV 持续感染的患者可能会进展为宫颈癌前病变甚至宫颈癌^[1]。使用本产品检测，当检测结果为阴性时，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低，可避免阴道镜及组织活检检查，做好定期复查；检测结果为阳性时，提示宫颈病变级别较高，需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查^[2]。

【检验原理】

本产品包括三个步骤：细胞裂解、亚硫酸氢盐转化和实时荧光 PCR。

步骤 1，细胞裂解：使用试剂盒内的裂解液对宫颈脱落细胞进行裂解，释放基因组 DNA；

步骤 2，亚硫酸氢盐转化：细胞裂解后用亚硫酸氢盐进行转化处理，DNA 上未发生甲基化的胞嘧啶 C 因脱氨基反应变成尿嘧啶 U，而发生甲基化的胞嘧啶 C 则不会被亚硫酸氢盐转化；

步骤 3，实时荧光 PCR：以转化后的 DNA 为模板做荧光 PCR 扩增，特异性的引物只能扩增发生甲基化的基因，从而检测 6 个基因 ASTN1 (Marker1)、DLX1 (Marker2)、ITGA4 (Marker3)、RXFP3 (Marker4)、SOX17 (Marker5)、ZNF671 (Marker6) 的甲基化状态。

本产品同时设置了内部质控 Marker QC 和 Marker QM，Marker QC 用于评估样本 DNA 是否足量以及亚硫酸氢盐转化质量是否合格，Marker QM 用于评估女性样本的正常甲基化状态。

【主要组成成分】

组分	主要成分	包装量
反应液	dNTPs、Taq DNA 聚合酶、Eva Green 染料	1.1 mL/支×1
八联管	6 个基因和 Marker QC、Marker QM 引物	12 条/盒×1
八联管盖	/	12 条/包×1
反应水	超纯水	2 mL/支×1
阳性质控	亚硫酸氢盐转化后的 SiHa 细胞 DNA 和人基因组 DNA 的混合液	90 μL/支×1
裂解液	裂解液	500 μL/支×1

注：请勿互换、混合或合并不同批号的试剂盒中的组分。

需要但未提供材料：

亚硫酸氢盐转化试剂盒：甲基化检测样本前处理试剂盒（上海捷诺生物科技有限公司，沪徐械备20200007号），或 EpiTect Fast DNA Bisulfite Kit (200) (QIAGEN，货号：59826)。

细胞保存液：细胞保存液 PreservCyt Solution (Hologic, Inc., 国械备20140197)，包装规格：20 mL。

采样拭子：一次性使用宫颈采样拭子（宁波华莱斯医疗器械有限公司，浙械注准20172411163）。

【储存条件及有效期】

储存条件：2~8°C保存。

有效期：12个月。

生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 实时荧光 PCR 仪

【样本要求】

1. 适用样本类型：宫颈脱落细胞。
2. 样本采集：需使用一次性宫颈采样拭子采样后，立即将其转移至细胞保存液中。
3. 样本保存和运输条件：建议室温保存不超过4周，2~8°C保存不超过12周。2~30°C条件下运输不超过3天。

【检验方法】

1. 液基细胞学样本的细胞裂解

本试剂盒中包含细胞裂解所需的细胞裂解液，根据以下步骤操作：

- a. 以最大速度涡旋混匀样本5秒，并立即转移1 mL样本到1.5 mL EP管中；
- b. 10000×g离心5分钟；
- c. 小心移除上清液，最多移出980 μL。注意：根据沉淀物量及样本状态决定移出量的体积；
- d. 向沉淀物中加入40 μL裂解液，并以最大速度涡旋混匀样本3秒；
- e. 将EP管放置在恒温摇匀仪中，设置60°C，1000rpm孵育样本30分钟，取出40 μL裂解样本进行后续的亚硫酸氢盐转化处理。

2. 亚硫酸氢盐处理和纯化DNA

参照厂家说明书操作使用亚硫酸氢盐转化试剂盒，**最终使用20 μL超纯水洗脱样本DNA。**

3. 配制PCR反应体系和加样

- a. 向步骤2洗脱得到的样本DNA中加入70 μL反应水，以最大速度涡旋混匀3秒，短暂离心；
- b. 从试剂盒中取出反应液和八联管，绿色管盖的八联管用于样本检测，红色管盖的八联管用于阳性质控，黄色管盖的八联管用于阴性质控（反应水）；

注意：八联管的方向。管口编号1~8分别代表Marker 1~Marker6、Marker QC和Marker QM。

- c. 每个八联管孔中加入10 μL反应液；

注意：因为八联管中已包含引物，为防止污染，每次加液后换枪头。

- d. 每条八联管检测一份样本，绿色管盖的八联管的每孔加入 10 μ L 样本；
- e. 黄色管盖的八联管每孔加 10 μ L 反应水，红色管盖的八联管每孔加 10 μ L 阳性质控；
注意：每次加样后换枪头，八联管有色管盖丢弃；
- f. 加样完成后盖上八联管透明管盖（试剂盒提供）；
注意：取出和盖上管盖时应避免接触管盖内侧；确保管盖已盖紧；
- g. 以最大速度涡旋充分混匀所有八联管 3 秒，短暂离心。

4. PCR 扩增

根据 PCR 仪器制造商提供的说明书对仪器进行以下设置：

- 1) 设置 Setup→实验属性 Experiment Properties，选择以下设置：7500（96 孔）；Quantitation - Standard Curve；勾选 SYBR® Green Reagents, Standard（~2h 结束），并勾选“Including Melt Curve”；
- 2) 设置 Setup→板设置 Plate setup→Define Targets and Samples，确定引物和样本名称；
- 3) 参比荧光（Reference Dye）：ROX；每孔反应体积 20 μ L；采集信号：“Cycling Stage, Step 2”（30 秒 Hold）和“Melt Curve Stage, Step 3”（1%heating phase）。

表 1：PCR 运行参数

步骤	温度	时间	升降温率	循环数
Step 1	94°C	60 秒	100%	/
Step 2	94°C	15 秒	100%	42
	67°C	30 秒*	100%	
Step 3	95°C	15 秒	100%	熔解曲线分析
	60°C	20 秒	100%	
	95°C	30 秒	1%*	
	30°C	60 秒	100%	

*设置采集信号

表 2：阈值和基线

阈值	基线起始 Ct	基线结束 Ct
0.5	5	20

5. PCR 结果导出及数据整理

- a. 请参照 PCR 仪器制造商提供的说明书，从 ABI7500 导出数据；
- b. 使用 Microsoft Excel 打开导出的结果文件；
- c. 可参考以下格式排列数据；

表 3：样本数据分析表

	Marker 1					Marker QC		Marker QM	
	Ct	Tm	Δ Ct	Ct	Tm	Δ Ct	Ct	Tm	Ct	Tm
样本 1										
样本 2										
样本 3										

.....									
阳性质控									
阴性质控									

6 个宫颈癌甲基化标志物 (Marker 1 ~ Marker 6)

ΔCt 值的计算公式为 $\Delta Ct = Ct (\text{Marker X}) - Ct (\text{Marker QC})$

- d. 导出数据 Ct 值与 Tm 值均在参考值范围内 (表 4 和表 5), 查看扩增曲线、熔解曲线的有效性
- 有效扩增曲线、熔解曲线如图 1 所示, 其 Ct 值与 Tm 值有效, 可用于后续结果分析。
 - 无效扩增曲线、熔解曲线如图 2 所示, 其 Ct 值与 Tm 值不作为有效值, 需重复实验。

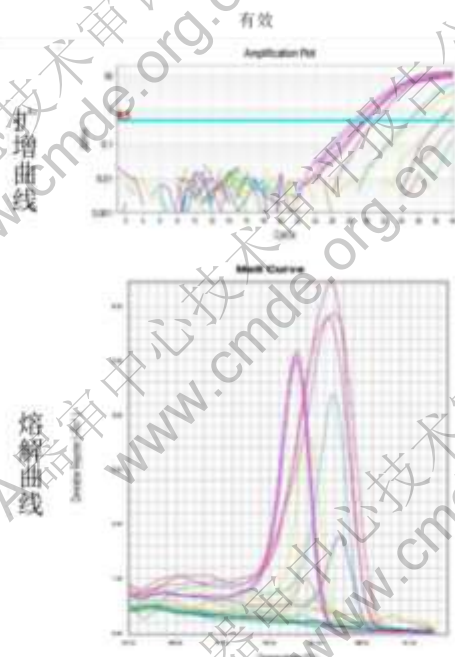


图 1

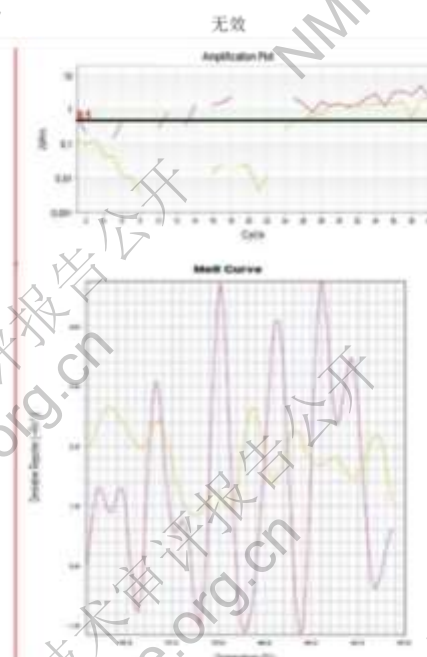


图 2

6. 质量控制

外部质控：

a. 阴性质控有效性：

阴性质控没有出现 Ct 值或 Tm 值, 或 Tm 值不在参考值范围内 (表 4 和表 5), 则阴性质控有效; 反之, 阴性质控无效, 需重复本次实验。

b. 阳性质控有效性：

阳性质控所有 Marker 的 Ct 值 ≤ 38 , Tm 值及 ΔCt 值在参考值范围内 (表 4 和表 5), 则阳性质控有效; 反之, 阳性质控无效, 需重复本次实验。

内部质控：

- a. 内部质控 Marker QC 反映细胞数量和亚硫酸氢盐转化质量, 用来评估非甲基化胞嘧啶 C 是否成功转化为尿嘧啶 U; 如果样本 Marker QC 的 Ct 值和 Tm 值不在其参考值范围内 (表 4), 则该样本检测结果无效, 需对其重新检测;

- b. 内部质控 Marker QM 是女性第二条 X 染色体上的甲基化基因，用于评估女性样本的正常甲基化状态；如果样本 Marker QM 的 Ct 值和 Tm 值不在其参考值范围内（表 4），则该样本检测结果无效，需对其重新检测。

表 4：Marker QC 及 Marker QM 的阳性判断值

标志物	Ct 值	Tm 值
Marker QC	20≤Ct 值≤36	77°C~81°C
Marker QM	≤42	78°C~86°C

【阳性判断值】

使用人 ASTN1、DLX1、ITGA4、RXFP3、SOX17、ZNF671 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）和一代测序分别检测 636 例样本中 6 个基因的甲基化情况，以一代测序结果为金标准，采用 ROC 曲线法确定每个基因 ΔCt 值的阳性判断值。

以病理结果为金标准，采用逻辑回归分析方法确定模型中 6 个基因的权重，建立 6 个基因的评分，然后根据约登指数最大的原则确定最佳阈值，最终确定本试剂盒的阳性判断值为 3。当 6 个基因分值总和 < 3 时，样本检测结果为阴性；当 6 个基因分值总和 ≥ 3 时，样本检测结果为阳性。6 个基因阳性判断值及评分见表 5。

表 5：样本 Marker1~Marker6 阳性判断值及评分

标志物	Ct 值	Tm 值	ΔCt	Marker 阳性评分	Marker 阴性评分
ASTN1	Ct 值 < 42	79~84°C	≤9.00	1	0
DLX1	Ct 值 < 42	79~83°C	≤9.00	1	0
ITGA4	Ct 值 < 42	79~83°C	≤9.00	1	0
RXFP3	Ct 值 < 42	79~83°C	≤9.00	1	0
SOX17	Ct 值 < 42	79~85°C	≤9.00	1	0
ZNF671	Ct 值 < 42	79~86°C	≤10.00	3	0

注：当 Ct 值、Tm 值均在范围内，则计算 ΔCt 值，计算公式为：

$$\Delta Ct = Ct (\text{Marker X}) - Ct (\text{Marker QC})。$$

【检验结果的解释】

以 Marker1~Marker6 评分的总和评判样本的阴阳性：

- 当 Marker1~Marker6 分值总和低于 3，则样本检测结果为阴性，提示无宫颈病变或宫颈病变级别较低，可避免阴道镜及组织活检检查，做好定期复查；
- 当 Marker1~Marker6 分值总和等于或高于 3，则样本检测结果为阳性，提示宫颈病变级别较高，需进一步进行阴道镜和/或组织活检检查。

【检验方法的局限性】

- 配合使用的人乳头瘤病毒（HPV）核酸检测试剂盒，检测范围应包含 12 种高危 HPV 基因型 31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68 中的部分或全部。

2. 样本检测结果阳性不能作为宫颈高级别病变及宫颈癌临床诊断的唯一依据，需结合其他的检查结果综合判断。

【产品性能指标】

1. 最低检出限：本试剂盒检测 6 个基因甲基化比率的最低检出限为：

名称	最低检出限
ASTN1	0.4%
DLX1	2%
ITGA4	0.4%
RXFP3	0.4%
SOX17	4%
ZNF671	0.2%

2. 阳性符合率：检测 7 份阳性参考品，检测结果应均为阳性。
3. 阴性符合率：检测 5 份阴性参考品，检测结果应均为阴性。
4. 精密度：重复检测精密度参考品 C1、C2，检测结果均为阳性且 Ct 值的变异系数（CV）应不大于 5.0%，检测精密度参考品 C3，检测结果均为阴性。
5. 稳定性：试剂盒置于 2~8℃ 保存至 12 个月，各项性能指标均应符合产品技术要求。
6. 交叉反应：交叉反应研究结果表明试剂盒检测非目标的其他基因甲基化阳性的宫颈脱落细胞样本，均无交叉反应。
7. 干扰试验：宫颈脱落细胞样本中含有 500mg/dL 血红蛋白、 1×10^6 个/mL 白细胞、宫颈粘液、20mg/mL 替硝唑阴道片、174mg/mL 保妇康栓、100mg/mL 重组干扰素 $\alpha 2b$ 凝胶、润滑剂，对本试剂盒的检测结果无影响。
8. 包容性：对不同宫颈癌组织类型样本的适用性进行研究，对宫颈癌组织类型为鳞癌、腺癌、腺鳞癌样本研究结果表明，本试剂盒适用于不同宫颈癌组织类型。
9. 临床试验结果：在 4 家临床试验机构进行临床试验，共纳入 1112 例病例，针对 30 岁以上 hrHPV 初筛阳性的人群，CIN2+ 水平，试剂盒的临床灵敏度为 86.21%，临床特异性为 93.97%；CIN3+ 水平，试剂盒的临床灵敏度为 95.35%，临床特异性为 86.20%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床管理应结合其症状、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 由于方法学或特异性等原因，使用不同生产商的试剂对同一份样本进行肿瘤标志物检测可能会得到不同的检测结果，因此，在肿瘤监测过程中，用不同试剂检测所得结果不应直接相互比较，以免造成错误的医学解释；建议实验室在发给临床医生的检测报告注明所用试剂特征。
3. 由于本产品的检测靶标为 DNA，操作过程中应特别注意防止 DNA 酶对 DNA 的降解作用，所有使用的器皿、加样器等均为专用，应使用无 DNA 酶的离心管、吸头等一次性耗材。
4. 检测前应完全理解本包装盒内产品和配套设备等说明书的内容及含义，以确保正确地使用本试剂盒。
5. 所有试剂应在规定的温度储存，使用时拿到室温下，使用后立即放回。试剂盒各组分使用前请充分摇匀，离心管内的试剂需离心数秒后使用。

6. 不可混用不同批号的试剂组分，不可使用超过有效期的试剂。
7. 每次实验需设置阴性质控和阳性质控。
8. 标本处理应在标本处理区进行，所有操作需采用无 DNA 酶的带滤芯枪头及离心管。
9. PCR 操作各阶段应在 PCR 实验室对应区域进行。应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性耗材。PCR 操作人员应具有相关实验经验和培训。
10. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

【参考文献】

- [1]魏丽惠,赵超.宫颈癌及其癌前病变的筛查研究进展[J/CD].中华妇幼临床医学杂志(电子版). 2016,12(01):16-19.
- [2]Alfred Hansel, Daniel Steinbach, Christiane Greinke, Martina Schmitz, Juliane Eiselt, Cornelia Scheungraber, Mieczyslaw Gajda, Heike Hoyer, Ingo B. Runnebaum. A Promising DNA Methylation Signature for the Triage of High-Risk Human Papillomavirus DNA-Positive Women. PLOS ONE: 9 (3), March 2014.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海捷诺生物科技有限公司

住所：上海市徐汇区银都路 466 号 3 号楼 1 层

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：上海市徐汇区银都路 466 号三号楼一楼，银都路 466 号一号楼二楼 201、203 室，龙吴路 2715 号一幢 104、106、108 室

生产许可证编号：沪食药监械生产许 20202655 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】