

受理号：CSZ2200277

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：染色体非整倍体和片段缺失检测试剂盒
(联合探针锚定聚合测序法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：华大生物科技（武汉）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.....	14
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

华大生物科技（武汉）有限公司

二、申请人住所

武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目 B、C、D 区研发楼 B2 栋

三、生产地址

武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目 B、C、D 区研发楼 B2 栋五楼、B1 栋一楼

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品主要组成成分见下表:

包装盒	试剂	主要组分	装量
包装盒 1	打断修复缓冲液	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷	290 μ L/管 \times 3 管
	打断修复酶	DNA 片段化酶、DNA 聚合酶 I	100 μ L/管 \times 3 管
	连接缓冲液	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷	1280 μ L/管 \times 3 管
	连接酶	连接酶	80 μ L/管 \times 3 管
	PCR 反应液	氯化镁、三羟甲基氨基甲烷、 PCR 酶	960 μ L/管 \times 3 管
	PCR 引物	寡聚脱氧核苷酸	80 μ L/管 \times 3 管
	阳性对照品 1	T21 阳性基因组 DNA ($10 \pm 1\text{ng}/\mu\text{L}$)	10 μ L/管 \times 3 管
	阳性对照品 2	染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征) 阳 性基因组 DNA ($10 \pm 1\text{ng}/\mu\text{L}$)	10 μ L/管 \times 3 管
	阴性对照品	阴性基因组 DNA ($10 \pm 1\text{ng}/\mu\text{L}$)	10 μ L/管 \times 3 管
	标签接头 1-96	寡聚脱氧核苷酸	18 μ L/孔 \times 96 孔
包装盒 2	磁珠	纳米磁珠	5500 μ L/管 \times 2 管
	洗脱缓冲液	Tris-HCl 缓冲液、EDTA	6000 μ L/管 \times 1 管
	分子级水	水	3000 μ L/管 \times 1 管

注意: 不同批次组分严禁混用。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测孕妇羊水样本中的 13、18、

21、X 和 Y 染色体非整倍体及染色体 4p16.3、染色体 22q11.2、染色体 5p15.2-5p、染色体 7q11.23、染色体 15q11-q13 区域的缺失情况。

用于产前筛查高风险孕妇、高龄孕妇、超声检查发现胎儿结构异常且怀疑存在 13、18、21、X、Y 等染色体数目异常或存在相关染色体片段缺失的孕妇，以及其他具有相关医学指征的孕妇，进行胎儿 13-三体综合征、18-三体综合征、21-三体综合征、特纳综合征、克氏综合征、超雌综合征、超雄综合征、Wolf-Hirschhorn 综合征、DiGeorge 综合征、Cri du Chat 综合征、Williams-Beuren 综合征、Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征的产前辅助诊断。

不适用于有染色体异常家族史或有既往不良孕产史或超声筛查胎儿结构发现明显异常的孕妇，不得用于非医学指征相关的性别鉴定。在进行该检测前和检测后，必须结合孕妇的临床情况（如胎儿超声检查情况）对孕妇及家属进行相关的产前遗传咨询。相关检测的开展应符合原卫生部发布的《产前诊断技术管理办法》的相关规定。在进行该检测前，必须与孕妇有充分的知情谈话，需说明该技术检测的内容、风险和技术局限性，并签署相关的知情同意书。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为产前诊断的唯一依据，临床医生应结合核型分析、超声检查等检测结果进行综合判断。阴性结果不能排除其他染色体异常，其结果

的确认应结合临床进行综合判断。

本试剂盒的检测项目应在有产前诊断资质的医疗机构中开展。项目申请的要求参照我国相关的卫生行业标准。申请检测的医师应是经过产前诊断专业培训的、有资质的医师。

本试剂盒对嵌合体样本的检出率较低，当样本为嵌合体时，会影响本试剂盒检测结果的准确性。

表 1 试剂盒检测的染色体非整倍体和片段缺失类型

变异类型	疾病信息	染色体片段缺失区域
常染色体非整倍体	13 号染色体非整倍体	/
	18 号染色体非整倍体	/
	21 号染色体非整倍体	/
性染色体非整倍体	X0	/
	XXX	/
	XXY	/
染色体片段缺失变异	染色体 4p16.3 缺失综合征 (Wolf-Hirschhorn 综合征)	4p16.3
	染色体 22q11.2 缺失综合征 (DiGeorge 综合征)	22q11.2
	Cri du Chat 综合征	5p15.2-5p
	染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征)	7q11.23
	Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征	15q11-q13

(三) 产品包装规格

96 人份/盒

(四) 产品检验原理

本试剂盒采用联合探针锚定聚合测序法，通过对 DNA 进行打断修复、接头连接、PCR 扩增及上机测序，获得样本的测序数据。采用染色体非整倍体和拷贝数变异检测软件对获得的测序数据根据生物统计学方法进行数据分析，并根据各条染色体上不同窗口对应的拷贝率和全基因组范围内的检验统计值，与正常样本获得的检验统计值比较找出变异区域，再根据变异区域的位置信息和长度判定非整倍体和片段缺失变异。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品主要原材料包括：PCR 引物、标签接头、PCR 反应液、DNA 片段化酶、rTaq 聚合酶、DNA 聚合酶 I、连接酶、磁珠、阳性对照品 1（T21 阳性基因组 DNA）、阳性对照品 2（染色体 7q11.23 缺失综合征（Williams-Beuren 综合征）阳性基因组 DNA）和阴性对照品。

主要原材料均为外购，引物和标签接头为申请人自行设计后委托专业的合成公司合成。通过功能性试验，申请人筛选出最佳原材料和供应商，同时制定了各主要原材料质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和对照品的设置情况

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、重复性参考

品和检测限参考品。阳性参考品 20 个，涵盖该产品可检出的所有变异类型，由人源细胞系基因组 DNA 制成。阴性参考品 10 个，由该试剂盒检测范围内变异阴性的人源细胞系或孕妇流产组织 DNA 制成。重复性参考品 4 个，由对应的变异类型的人源细胞系基因组 DNA 制成。检测限参考品 24 个，包括最低浓度和最低嵌合度检测限参考品，涵盖该产品可检出的所有变异类型。

(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：样本采集及处理、打断修复酶加入量、dNTP 加入量、打断修复反应时间、打断修复反应温度、连接酶加入量、标签接头加入量、连接反应时间、连接反应温度、PCR 反应液加入量、PCR 引物用量、PCR 退火温度、PCR 循环数、筛选磁珠用量、DNA 投入量、数据量研究等，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

本产品分析性能评估内容包括准确性、精密度、检出限、分析特异性、干扰物质、核酸提取性能研究。

1. 准确性研究

(1) 使用 3 批成品试剂盒在所有适用机型上对阳性参考品、阴性参考品、重复性参考品和检测限参考品分别进行

检测，检测结果显示阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、最低检测限、重复性参考品符合率均为 100%。

(2) 与临床产前诊断金标准及 CMA 检测结果的比较

申请人采用试剂盒对各种染色体非整倍体异常样本、不同片段大小和不同嵌合比例的染色体片段缺失样本进行检测，与核型分析结果（金标准）或 CMA 结果比较，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，检测总符合率为 100%，Kappa 系数为 1.00，与临床已知检测结果相比具有很好的一致性。

2. 精密度研究

精密度研究中，申请人在所有适用机型上由两组实验员每天上午、下午采用 3 批成品试剂盒对阴性、强阳性、临界阳性样本各检测一次，重复 20 天；另两组实验员在不同实验室使用不同仪器，每天采用 1 批成品试剂盒对阴性、强阳性、临界阳性样本各检测一次，重复 20 天，结果显示符合率为 100%，表明本产品批内/批间、日内/日间、不同地点、不同操作者之间的精密度性能良好。

3. 检出限研究

检出限研究中，申请人在所有适用机型上对 DNA 起始浓度、嵌合度和染色体缺失片段大小三个方面进行评价，对不同浓度梯度和不同嵌合度梯度的样本检测，采用 95% 的阳性检出率作为标准，确定了本试剂盒检测 13、18、21、X（女性）染色体非整倍体的最低检测限为“基因组 DNA 浓度

1.5ng/ μ L（最低基因组 DNA 投入量为 30ng）水平的 20%嵌合度”，检测 XXY、XYY 和 5 种染色体片段缺失变异的最低检测限为“基因组 DNA 浓度 1.5ng/ μ L（最低基因组 DNA 投入量为 30ng）水平的 30%嵌合度”。并重复检测临床上可获取的“常见缺失片段范围”下限范围的临床样本，均准确检出相应的变异阳性。

4. 分析特异性研究

申请人使用本产品对检测范围以外的染色体异常样本（T7、T15、1q21.1del、2p23.1del、2p22.3dup、2q36.3dup、5p15.2del、6q23.3dup、13q32.1del、13q31.1dup、15q11.2dup、17q11.2dup、17p12del、18q12.1del、18p11.21dup、21q22.12del、21q22.3dup、22q11.21del、Xq27.3del、Xp22.31dup、Yq11.223del、Yq11.223dup）进行检测，包括检测范围内的非整倍体所在染色体的片段缺失、重复样本，检测范围内的染色体片段缺失所在染色体的非整倍体样本，和不在检测范围内染色体上的非整倍体及片段缺失、重复样本，均未检出检测范围内的异常，不影响本产品的分析性能。

5. 干扰物质研究

（1）使用本产品对分别加入了不同梯度内源和外源干扰物质的样本进行评价，结果显示：羊水样本中含有尿素浓度 ≤ 2 mg/mL、肌酐浓度 ≤ 0.2 mg/mL、氯化钠浓度 ≤ 4 mg/mL、

甘油三酯浓度 ≤ 60 mg/L、尿酸浓度 ≤ 0.2 mg/mL、血红蛋白浓度 ≤ 10 mg/mL 时，对本产品检测结果无影响。

(2) 母体细胞污染研究

使用本产品对不同浓度母体细胞污染样本进行评价，结果显示：母体细胞污染浓度 $\leq 30\%$ 时，对本产品检测结果无影响。

6. 核酸提取试剂盒性能研究

申请人采用临床样本平行比较了不同厂家核酸提取试剂的提取性能，并根据与本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需求。

(四) 阳性判断值研究

申请人采用已知检测结果的 299 例临床样本，通过百分位数法统计确定了阳性参考区间，另采用 199 例临床样本和 30 例嵌合体样本进行了阳性参考区间验证，最终确定阳性参考区间如下：

(1) 13、18、21、X（女性）染色体非整倍体阳性参考区间： $CR \leq 0.95$ 或 $CR \geq 1.05$ 。 $CR \leq 0.95$ 判定为对应染色体单体阳性；其中， $0.7 < CR \leq 0.95$ 提示存在嵌合； $CR \geq 1.05$ 判定为对应染色体三体阳性；其中， $1.05 \leq CR < 1.30$ 提示存在嵌合。

(2) XXY、XYY 阳性参考区间： $CR \geq 1.20$ ；其中， $1.20 \leq CR < 1.60$ 提示存在嵌合。

(3) 5 种染色体片段缺失阳性参考区间： $CR \leq 0.85$ ；其中， $0.70 < CR \leq 0.85$ 提示存在嵌合。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

实时稳定性研究：采用三批试剂盒储存于 -18°C 以下和 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别于不同时间点，对其阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、最低检测限和重复性参考品符合率进行考察，确定本产品包装盒 1 置于 -18°C 以下保存，包装盒 2 置于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期均为 12 个月。

本产品开瓶后置于储存条件下保存 3 个月仍可有效检测；包装盒 1 冻融 5 次仍可有效检测；包装盒 1 于 -18°C 以下运输，包装盒 2 于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 运输，可运输 7 天。

样本稳定性：样本可在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 短暂储存 24 小时，在 -18°C 以下储存 3 年，反复冻融次数应不超过 5 次；样本运输不超过 24 小时，可置于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ 运输；样本运输超过 24 小时，应置于 -18°C 以下运输，运输时间应不超过 7 天。

三、临床评价概述

本产品在浙江大学医学院附属妇产科医院、宁波市妇女儿童医院、长沙市妇幼保健院、内蒙古自治区妇幼保健院、广州市妇女儿童医疗中心五家临床试验机构开展临床试验；

采用试验体外诊断试剂分别与染色体核型分析、染色体微阵列分析 (CMA) 进行比较研究, 确认本产品的临床性能。样本类型为羊水样本。

与核型分析对比, 临床试验共纳入有效病例 1358 例, 其中 13 号染色体三体阳性病例 19 例, 18 号染色体三体 63 例, 21 号染色体三体 84 例, 性染色体非整倍体 99 例。性染色体非整倍体样本中包括核型分析为 (45, X0) 的病例 22 例以及核型分析含 (45, X0) 嵌合体病例 1 例, (47, XXY) 病例 37 例, (47, XXX) 病例 22 例, (47, XYY) 病例 19 例。试验体外诊断试剂检测 13 号、18 号和 21 号染色体三体的灵敏度和特异度均为 100%。试验体外诊断试剂检测 (45, X0) 以及含 (45, X0) 的嵌合体病例灵敏度 91.3%, 特异度 100%; 检测 (47, XXY) 灵敏度 100%, 特异度 100%; 检测 (47, XXX) 灵敏度 100%, 特异度 100%; 检测 (47, XYY) 灵敏度 100%, 特异度 100%。其中不一致样本 2 例, 1 例为核型分析为性染色体嵌合体, 试验体外诊断试剂未检测异常; 1 例核型分析为 (45, X0), 试验体外诊断试剂检测到小 Y 染色体片段, 未报告特纳综合征, 分析可能亦为嵌合体影响。

与染色体微阵列分析 (CMA) 对比, 临床试验共纳入有效病例 1361 例, 其中染色体 4p16.3 缺失综合征 (Wolf-Hirschhorn 综合征) 11 例, 染色体 22q11.2 缺失综合征 (DiGeorge 综合征) 42 例, Cri du Chat 综合征 11 例, 染

染色体 7q11.23 缺失综合征(Williams-Beuren 综合征)11 例, Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征 7 例。临床灵敏度均为 100%, 特异度均为 100%。

综上所述, 该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了全面研究, 临床试验结果基本符合临床应用要求。该产品预期用途包含 Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征、Williams-Beuren 综合征辅助诊断, 该两种疾病为列入罕见病目录的疾病, 按照《用于罕见病防治医疗器械注册审查指导原则》的相关要求申请人需在该产品上市后进一步完成以下工作: 请申请人于上市后收集临床应用数据, 将本产品检测结果与临床诊断结论进行对比, 针对以上两种罕见病, 每种应至少收集到 10 例确诊病例, 评价本产品临床性能。相关资料应由临床机构签章, 于产品延续注册时提交。

四、产品受益风险判定

根据申请人提供的申报资料, 经综合评价, 在目前认知水平上, 认为该产品上市带来的受益大于风险。但为保证用械安全, 基于对主要剩余风险的规避, 已在产品说明书中提示以下信息:

不适用于有染色体异常家族史或有既往不良孕产史或超声筛查胎儿结构发现明显异常的孕妇, 不得用于非医学指征相关的性别鉴定。在进行该检测前和检测后, 必须结合孕妇的临床情况(如胎儿超声检查情况)对孕妇及家属进行相

关的产前遗传咨询。相关检测的开展应符合原卫生部发布的《产前诊断技术管理办法》的相关规定。在进行该检测前，必须与孕妇有充分的知情谈话，需说明该技术检测的内容、风险和技术局限性，并签署相关的知情同意书。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为产前诊断的唯一依据，临床医生应结合核型分析、超声检查等检测结果进行综合判断。阴性结果不能排除其他染色体异常，其结果的确认应结合临床进行综合判断。

本试剂盒的检测项目应在有产前诊断资质的医疗机构中开展。项目申请的要求参照我国相关的卫生行业标准。申请检测的医师应是经过产前诊断专业培训的、有资质的医师。

本试剂盒对嵌合体样本的检出率较低，当样本为嵌合体时，会影响本试剂盒检测结果的准确性。

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

该产品为用于罕见病的体外诊断试剂，申请人的注册申报资料基本符合现行要求，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，经系统评价后，建议准予注册。该产品预期用途包含 Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征、Williams-Beuren 综合征辅助诊断，该两种疾病为列入罕见病目录的疾病，按照《用于罕见病防治医疗器械注册审查指导原则》的相关要求，申请人于上市后收集临床应用数据，将本产品检测结果与临床诊断结论进行对比，针对以上两种罕见病，每种应至少收集到 10 例确诊病例，评价本产品临床性能。相关资料应由临床机构签章，于产品延续注册时提交。

2024 年 2 月 8 日

附件：产品说明书

染色体非整倍体和片段缺失检测试剂盒 (联合探针锚定聚合测序法)

说明书

【产品名称】

染色体非整倍体和片段缺失检测试剂盒（联合探针锚定聚合测序法）

【包装规格】

96人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测孕妇羊水样本中的 13、18、21、X 和 Y 染色体非整倍体及染色体 4p16.3、染色体 22q11.2、染色体 5p15.2-5p、染色体 7q11.23、染色体 15q11-q13 区域的缺失情况。

用于产前筛查高风险孕妇、高龄孕妇、超声检查发现胎儿结构异常且怀疑存在 13、18、21、X、Y 等染色体数目异常或存在相关染色体片段缺失的孕妇，以及其他具有相关医学指征的孕妇，进行胎儿 13-三体综合征、18-三体综合征、21-三体综合征、特纳综合征、克氏综合征、超雌综合征、超雄综合征、Wolf-Hirschhorn 综合征、DiGeorge 综合征、Cri du Chat 综合征、Williams-Beuren 综合征、Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征的产前辅助诊断。

不适用于有染色体异常家族史或有既往不良孕产史或超声筛查胎儿结构发现明显异常的孕妇，不得用于非医学指征相关的性别鉴定。在进行该检测前和检测后，必须结合孕妇的临床情况（如胎儿超声检查情况）对孕妇及家属进行相关的产前遗传咨询。相关检测的开展应符合原卫生部发布的《产前诊断技术管理办法》的相关规定。在进行该检测前，必须与孕妇有充分的知情谈话，需说明该技术检测的内容、风险和技术局限性，并签署相关的知情同意书。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为产前诊断的唯一依据，临床医生应结合核型分析、超声检查等检测结果进行综合判断。阴性结果不能排除其他染色体异常，其结果的确认应结合临床进行综合判断。

本试剂盒的检测项目应在有产前诊断资质的医疗机构中开展。项目申请的要求参照我国相关的卫生行业标准。申请检测的医师应是经过产前诊断专业培训的、

有资质的医师。

本试剂盒对嵌合体样本的检出率较低，当样本为嵌合体时，会影响本试剂盒检测结果的准确性。

表 1 试剂盒检测的染色体非整倍体和片段缺失类型

变异类型	疾病信息	染色体片段缺失区域
常染色体非整倍体	13 号染色体非整倍体	/
	18 号染色体非整倍体	/
	21 号染色体非整倍体	/
性染色体非整倍体	X0	/
	XXX	/
	XXY	/
	XYY	/
染色体片段缺失变异	染色体 4p16.3 缺失综合征 (Wolf-Hirschhorn 综合征)	4p16.3
	染色体 22q11.2 缺失综合征 (DiGeorge 综合征)	22q11.2
	Cri du Chat 综合征	5p15.2-5p
	染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征)	7q11.23
	Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征	15q11-q13

染色体疾病是由染色体数目异常或结构异常所致的疾病，其发生具有偶然性、随机性特点，可导致自然流产、先天畸形、智力障碍、发育迟缓。研究表明，染色体异常是导致自然流产、产前胎儿畸形、智力障碍、发育迟缓的主要原因之一。在产前胎儿畸形中，大约 37%由染色体异常引起^[1-2]。目前常见的染色体非整倍体和拷贝数异常为 13、16、18、21、22、X 和 Y 染色体非整倍体和 5 种缺失综合征。通过非整倍体和拷贝数变异检测，结合父母/夫妇的遗传背景，可辅助临床上查找胎儿畸形等情况的遗传学病因。

针对染色体非整倍体和拷贝数变异检测的方法主要有传统的核型分析、荧光原位杂交技术(Fluorescence In Situ Hybridization, FISH)、染色体微阵列分析(Chromosomal Microarray Analysis, CMA)、高通量测序技术等。

【检验原理】

本试剂盒采用联合探针锚定聚合测序法，通过对 DNA 进行打断修复、接头连接、PCR 扩增及上机测序，获得样本的测序数据。采用染色体非整倍体和拷贝

数变异检测软件对获得的测序数据根据生物统计学方法进行数据分析,并根据各条染色体上不同窗口对应的拷贝率和全基因组范围内的检验统计值,与正常样本获得的检验统计值比较找出变异区域,再根据变异区域的位置信息和长度判定非整倍体和片段缺失变异。

【主要组成成分】

表2 主要组成成分

包装盒	试剂	主要组分	装量
包装盒 1	打断修复缓冲液	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷	290 μ L/管 \times 3 管
	打断修复酶	DNA 片段化酶、DNA 聚合酶 I	100 μ L/管 \times 3 管
	连接缓冲液	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷	1280 μ L/管 \times 3 管
	连接酶	连接酶	80 μ L/管 \times 3 管
	PCR 反应液	氯化镁、三羟甲基氨基甲烷、PCR 酶	960 μ L/管 \times 3 管
	PCR 引物	寡聚脱氧核苷酸	80 μ L/管 \times 3 管
	阳性对照品 1	T21 阳性基因组 DNA(10 \pm 1ng/ μ L)	10 μ L/管 \times 3 管
	阳性对照品 2	染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征) 阳性基因组 DNA(10 \pm 1ng/ μ L)	10 μ L/管 \times 3 管
	阴性对照品	阴性基因组 DNA(10 \pm 1ng/ μ L)	10 μ L/管 \times 3 管
	标签接头 1-96	寡聚脱氧核苷酸	18 μ L/孔 \times 96 孔
包装盒 2	磁珠	纳米磁珠	5500 μ L/管 \times 2 管
	洗脱缓冲液	Tris-HCl 缓冲液、EDTA	6000 μ L/管 \times 1 管
	分子级水	水	3000 μ L/管 \times 1 管

注意: 不同批次组分严禁混用。

检测所需但未提供的主要设备和材料:

设备: 离心机(台式、板式或掌式离心机)、漩涡混合器、磁力架、PCR仪、Qubit 荧光定量仪或酶标仪或其他浓度测定同等功能的仪器。

材料: 无水乙醇(分析纯)和分子级水(无DNase活性)、96孔PCR反应板或PCR管以及离心管、Qubit dsDNA HS Assay kit(Thermo Fisher Scientific公司生产)或 Exkubit dsDNA HS Assay Kit (ExCell Bio公司生产)、核酸提取试剂(医疗器械备案凭证编号: 鄂汉械备20150250号)、测序反应通用试剂盒(联合探针锚定聚合测序法)(适用机型: BGISEQ-500)(医疗器械备案凭证编号: 鄂汉械备

20160193号)、测序反应通用试剂盒(联合探针锚定聚合测序法)(适用机型: MGISEQ-2000)(医疗器械备案凭证编号:鄂汉械备20190039号,武汉华大智造科技有限公司)、染色体非整倍体和拷贝数变异检测软件(KY-100K-1、KY-100K-2)(医疗器械注册证编号:)。

【储存条件及有效期】

包装盒1置于-18℃以下保存,包装盒2置于2℃~8℃保存,有效期均为12个月;生产日期、失效日期:见标签。开瓶后保存3个月仍可有效检测;包装盒1于-18℃以下运输,包装盒2于2℃~8℃运输,可运输7天;包装盒1冻融5次仍可有效检测,使用时尽量避免反复冻融。

【适用仪器】

基因测序仪(BGISEQ-500)、基因测序仪(MGISEQ-2000)

【样本要求】

1. 样本采集:

具体采集操作遵照临床标准流程进行。采集至少3mL羊水样本,并使用15mL灭菌带盖离心管(高度12cm,直径1.8cm)保存。寄送样本前,可将样本放置于2℃~8℃短暂储存,长期保存应置于-18℃以下储存。

2. 样本保存:

羊水样本可在2℃~8℃短暂储存24小时,在-18℃以下储存3年,反复冻融次数应不超过5次。

3. 样本运输:

样本运输不超过24小时,可置于2℃~8℃运输;样本运输超过24小时,应置于-18℃以下运输,运输时间应不超过7天。

禁止将样本在室温状态下运输。运输过程中容器应包装于有缓冲填塞物的硬纸盒或硬塑箱内,避免挤压、跌落,以免容器破裂、开盖,样本污染。

4. 样本安全性:

所有样本均视为有潜在的感染性,操作时按国家相关标准执行。

【检验方法】

一、试剂准备

将包装盒1中的打断修复酶和连接酶短暂离心后置于冰上备用(其中打断修

复酶在使用前需用移液器吹打充分混合); 包装盒1的其他试剂置于冰上融化, 振荡混匀, 短暂离心后置于冰上备用, 使用完后剩余试剂应立即放回-18℃以下保存。

将包装盒2中的磁珠置于室温平衡30min, 使用前在漩涡振荡器上充分混合, 使用完后剩余磁珠需放回2℃~8℃保存; 洗脱缓冲液和分子级水取出后可置于室温保存。

采用无水乙醇及分子级水(自备)配制75%乙醇, 现配现用。

二、 检测程序

1. 基因组 DNA 提取

推荐使用华大生物科技(武汉)有限公司生产的“核酸提取试剂”(医疗器械备案凭证编号: 鄂汉械备20150250号), 严格按照说明书操作步骤进行羊水基因组DNA的提取, 提取后用50 μL洗脱缓冲液溶解DNA, 然后使用Qubit荧光定量仪或酶标仪及配套试剂(或其他同等类型仪器、配套试剂)进行定量检测, DNA总量大于75ng。若满足条件, 可进行下步文库制备; 若不满足条件, 需重新进行提取。

提取的基因组DNA溶液可在2℃~8℃暂存3天, 在-18℃以下储存6个月, 反复冻融次数不超过6次。

2. 文库制备

对步骤1提取的基因组DNA通过打断修复、接头连接、PCR扩增进行文库制备。

2.1. 打断修复

2.1.1 分别取 50ng (要求 DNA 加入量 \geq 30ng, 样本量充足时推荐使用 50ng DNA) 基因组 DNA 样本、阴性对照品以及阳性对照品至新 PCR 管中, 用分子级水补足至 20μL, 漩涡振荡器上充分混合后瞬时离心;

注: 基因组 DNA 样本、阴性对照品以及阳性对照品的取样体积 (μL) = 50 ng / DNA 的浓度 (ng/μL)。其中, 阴、阳性对照品 DNA 的浓度均为 10 ng/μL。

2.1.2 根据表 3 的比例在新离心管中配制检测所需量的打断修复反应混合液;

表 3 打断修复反应混合液

试剂名称	一个反应标准量
------	---------

打断修复缓冲液	7.5 μ L
打断修复酶	2.5 μ L
总体积	10 μ L

2.1.3 向步骤 2.1.1 PCR 管中分别加入 10 μ L 打断修复反应混合液，漩涡振荡器上充分混合，瞬时离心，置于 PCR 仪上 37 $^{\circ}$ C 孵育 15min，65 $^{\circ}$ C 孵育 15min，冷却至 4 $^{\circ}$ C 保持。反应结束，取出 PCR 管，瞬时离心。

2.2. 接头连接

2.2.1 根据表 4 的比例在新离心管中配制检测所需量的连接反应混合液；

表 4 连接反应混合液

试剂	一个反应标准量
接头连接缓冲液	33 μ L
连接酶	2 μ L
总体积	35 μ L

2.2.2 向步骤 2.1.3 的 PCR 管中分别加入 15 μ L 标签接头 1-96（每个样本一个标签接头）以及 35 μ L 连接反应混合液，漩涡振荡器上充分混合后瞬时离心，置于 PCR 仪上 23 $^{\circ}$ C 孵育 20min，冷却至 4 $^{\circ}$ C 保持。反应结束后取出 PCR 管，瞬时离心；

2.2.3 将连接后的产物转移至装有 40 μ L 磁珠的离心管中，置于漩涡振荡器上充分混合，室温静置 5min，瞬时离心后置于磁力架 3min 至溶液澄清，弃上清液；

2.2.4 向步骤 2.2.3 的离心管中加入 200 μ L 75%乙醇，吹打 5-6 次，置于磁力架 3min 至溶液澄清，弃上清液；

2.2.5 重复 2.2.4 一次，室温静置 2min，从磁力架上取下离心管；

2.2.6 加入 25 μ L 洗脱缓冲液，漩涡振荡器上充分混合，室温静置 5min，瞬时离心，置于磁力架 3min 至溶液澄清，取 23 μ L 上清液于新 PCR 管中。

2.3. PCR 扩增

2.3.1 根据表 5 的比例在新离心管中配制检测所需量的 PCR 反应混合液；

表 5 PCR 反应混合液

试剂	一个反应标准量
PCR 反应液	25 μ L
PCR 引物	2 μ L
总体积	27 μ L

2.3.2 向步骤 2.2.6 的 PCR 管中加入 27 μ L PCR 反应混合液，漩涡振荡器上充分混合，瞬时离心，运行表 6 的 PCR 反应程序；

表 6 PCR 反应程序

温度	时间	循环数
95 $^{\circ}$ C	3min	1
98 $^{\circ}$ C	15s	7
56 $^{\circ}$ C	15s	
72 $^{\circ}$ C	30s	
72 $^{\circ}$ C	5min	1
4 $^{\circ}$ C	保持	1

2.3.3 反应结束后取出 PCR 管，瞬时离心，进行下一步产物纯化；若不能及时进行下一步操作，则将样本取出 4 $^{\circ}$ C 暂存，-20 $^{\circ}$ C 长期保存；

2.3.4 将 PCR 扩增后的产物加入到分装有 25 μ L 磁珠的离心管中，漩涡振荡器上充分混合，室温静置 5min，瞬时离心，置于磁力架 3min 至溶液澄清，吸取上清至新的离心管中；

注意：步骤 2.3.4 保留上清，丢弃磁珠。

2.3.5 向步骤 2.3.4 的离心管中加入 25 μ L 磁珠，漩涡振荡器上充分混合，室温静置 5min，瞬时离心，置于磁力架 3min 至溶液澄清，丢弃上清，保留磁珠；

2.3.6 向步骤 2.3.5 的离心管中加入 200 μ L 75% 乙醇，吹打 10 次，置于磁力架 3min 至溶液澄清，弃上清液；

2.3.7 重复步骤 2.3.6 一次，室温晾干或 40 $^{\circ}$ C 温浴至磁珠表面无反光，从磁力架上取下离心管；

2.3.8 加入 25 μ L 洗脱缓冲液，置于漩涡振荡器上充分混合，室温静置 5min，瞬时离心，置于磁力架 3min 至溶液澄清，取 23 μ L 上清液于新 PCR 管中。

2.3.9 使用 Qubit 荧光定量仪或酶标仪及配套试剂（或其他同等类型仪器、配套

试剂)对步骤 2.3.8 所得的 PCR 扩增反应后的产物(即文库)进行浓度测定,以文库浓度 $\geq 2\text{ng}/\mu\text{L}$ 为合格标准。若满足文库合格标准,则文库出库,可进行下步测序反应;若不满足文库合格标准,则认为建库失败,需重新建库。

3. 测序反应

推荐使用华大生物科技(武汉)有限公司生产的“测序反应通用试剂盒(联合探针锚定聚合测序法)”(医疗器械备案凭证编号:鄂汉械备20160193号)或“测序反应通用试剂盒(联合探针锚定聚合测序法)”(医疗器械备案凭证编号:鄂汉械备20190039号)进行测序反应,严格按照说明书操作。

4. 数据分析

使用染色体非整倍体和拷贝数变异检测软件(KY-100K-1、KY-100K-2)(医疗器械注册证编号:)进行数据分析,严格按照说明书操作。

【阳性判断值】

染色体非整倍体和片段缺失变异采用检测值(Copy Ratio, CR)的数值范围进行阳性判断,CR为检出染色体拷贝数的归一化。

(1) 13、18、21、X(女性)染色体非整倍体阳性参考区间: $\text{CR} \leq 0.95$ 或 $\text{CR} \geq 1.05$ 。

$\text{CR} \leq 0.95$ 判定为对应染色体单体阳性;其中, $0.7 < \text{CR} \leq 0.95$ 提示存在嵌合;

$\text{CR} \geq 1.05$ 判定为对应染色体三体阳性;其中, $1.05 \leq \text{CR} < 1.30$ 提示存在嵌合;

(2) XXY、XYY 阳性参考区间: $\text{CR} \geq 1.20$;其中, $1.20 \leq \text{CR} < 1.60$ 提示存在嵌合。

(3) 5 种染色体片段缺失阳性参考区间: $\text{CR} \leq 0.85$;其中, $0.70 < \text{CR} \leq 0.85$ 提示存在嵌合。

疾病匹配规则如下表所示:

检测疾病	匹配规则
染色体 4p16.3 缺失综合征 (Wolf-Hirschhorn 综合征)	缺失区段与 chr4:331568-2010962 区域重合度 $\geq 70\%$
染色体 22q11.2 缺失综合征 (DiGeorge 综合征)	缺失区段至少包含 TBX1 基因 (chr22:19744226-19754855)的部分编码区或剪切区域
Cri du Chat 综合征	缺失区段包含完整 CTNND2 基因 (chr5:10971952-11904110)或完整 TERT 基因 (chr5:1253287-1295162),

	且 CNV>560 kb
染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征)	缺失区段包含完整 ELN 基因 (<i>chr7:73442427-73484236</i>)
Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征	缺失区段包含 UBE3A 基因 (<i>chr15:25582396-25684175</i>) 部分的编码区或剪切区域, 或完整 NDN 基因 (<i>chr15:23930554-23932450</i>) 或完整 SNRPN 基因 (<i>chr15:25101698-25223729</i>), 且 CNV>4M

【检验结果的解释】

1. 质量控制

(1) 每次检测结果应同时满足: 阴性对照品检测结果为“未检出检测范围内的异常”, 阳性对照品 1 检测结果为“21 三体阳性”, 阳性对照品 2 检测结果为“染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征) 阳性”, 否则检测结果视为无效, 需重新检测。

(2) 单样本的数据量要求唯一比对的序列数 (Unique Reads, UR) 不低于 20M, 当 UR<20M 时, 表明数据量不足, 判定为检测失败, 需重新检测。

(3) 唯一比对序列的 GC 含量统计范围为 38%~43%, 当 GC 含量超出范围 38%~43% 时, 表明 GC 含量异常, 判定为检测失败, 需重新检测。

(4) 各染色体序列数的归一化值的波动系数 CV 应小于等于 0.1, 当波动系数 CV>0.1 时, 表明数据波动, 判定为检测失败, 需重新检测。

2. 结果判定

检测疾病	阳性参考区间	结果判定	备注
13 号染色体非整倍体	CR≤0.95	13 号染色体单体阳性; 当 0.70<CR≤0.95, 提示存在嵌合	/
	CR≥1.05	13 号染色体三体阳性; 当 1.05≤CR<1.30, 提示存在嵌合	/
18 号染色体非整倍体	CR≤0.95	18 号染色体单体阳性; 当 0.70<CR≤0.95, 提示存在嵌合	/
	CR≥1.05	18 号染色体三体阳性; 当 1.05≤CR<1.30, 提示存在嵌合	/
21 号染色体非整倍体	CR≤0.95	21 号染色体单体阳性; 当 0.70<CR≤0.95, 提示存在嵌合	/
	CR≥1.05	21 号染色体三体阳性;	/

		当 $1.05 \leq CR < 1.30$, 提示存在嵌合	
X0	$CR \leq 0.95$	X0 阳性; 当 $0.70 < CR \leq 0.95$, 提示存在嵌合	当 X0 /XXX /XXY /XYY 四种疾病中至少有一个结果为阳性或嵌合时, 其他三种疾病的 CR 为“-”;
XXX	$CR \geq 1.05$	XXX 阳性; 当 $1.05 \leq CR < 1.30$, 提示存在嵌合	
XXY	$CR \geq 1.20$	XXY 阳性; 当 $1.20 \leq CR < 1.60$, 提示存在嵌合	
XYY	$CR \geq 1.20$	XYY 阳性; 当 $1.20 \leq CR < 1.60$, 提示存在嵌合	
染色体 4p16.3 缺失综合征 (Wolf-Hirschhorn 综合征)	$CR \leq 0.85$	染色体 4p16.3 缺失综合征 (Wolf-Hirschhorn 综合征) 阳性; 当 $0.70 < CR \leq 0.85$, 提示存在嵌合	/
染色体 22q11.2 缺失综合征 (DiGeorge 综合征)	$CR \leq 0.85$	染色体 22q11.2 缺失综合征 (DiGeorge 综合征) 阳性; 当 $0.70 < CR \leq 0.85$, 提示存在嵌合	/
Cri du Chat 综合征	$CR \leq 0.85$	Cri du Chat 综合征阳性; 当 $0.70 < CR \leq 0.85$, 提示存在嵌合	/
染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征)	$CR \leq 0.85$	染色体 7q11.23 缺失综合征 (Williams-Beuren 综合征) 阳性; 当 $0.70 < CR \leq 0.85$, 提示存在嵌合	/
Angelman 综合征 /Prader-Willi 综合征	$CR \leq 0.85$	Angelman 综合征/Prader-Willi 综合征阳性; 当 $0.70 < CR \leq 0.85$, 提示存在嵌合	

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 不能作为诊断的唯一依据。对患者的临床诊断应结合临床金标准结果以及其症状/体征、病史等情况综合考虑;
2. 本试剂盒适用于需进行产前诊断的孕妇羊水样本检测, 不适用于其它样本检测;
3. 本检测不适用于单绒毛膜单羊膜囊双胎、染色体高度重复、高度固缩区域的染色体异常和拷贝数变异 (如着丝粒、端粒区、以及近着丝粒与端粒区域等)、易位 (如罗伯逊易位)、倒位、单亲二倍体、低比例嵌合体、点突变和小于 100Kb 的拷贝数变异等情况的检测, 均有可能导致假阳性或假阴性结果;
4. 孕妇羊水样本采集过程中可能存在母体本身 DNA 的污染, 为尽量减少可避免的干扰因素, 建议严格按样本采集要求进行样本采集;
5. 样本采集、运输及处理不当、未按说明书操作均有可能导致假阳性或假阴性结果, 因此在样本采集、保存、运输中需遵循以下原则:

- 1) 禁止将样本在室温状态下运输；
- 2) 运输过程中容器应包装于有缓冲填充物的硬纸盒或硬塑箱内，避免挤压、跌落，以免容器破裂、开盖，样本污染。

【产品性能指标】

1. 参考品检测

(1) 准确性

检测试剂盒范围内的染色体非整倍体国家阳性参考品或经标化的企业阳性参考品 (P1~P7)，结果均为相应的染色体非整倍体。

检测试剂盒范围内的微缺失微重复国家阳性参考品或经标化的企业阳性参考品 (P8~P20)，结果均为相应的染色体片段缺失，且缺失区域与对照方法检测缺失区域的交叠区域均在对照方法检测缺失区域的80%~100%范围内。

(2) 特异性

检测试剂盒范围外的国家阳性参考品、国家阴性参考品或经标化的企业阴性参考品 (N1~N10)，结果均为未检出试剂盒范围内的染色体非整倍体和片段缺失。

(3) 检测限

DNA总量不高于30ng条件下，检测试剂盒范围内的国家阳性参考品或企业阳性参考品 (P1~P12)，结果均为相应的染色体非整倍体和片段缺失。DNA总量不高于30ng条件下，检测嵌合度20%的L1-L5，嵌合度30%的L6-L12共12份企业检测限参考品，结果均为相应的染色体非整倍体和片段缺失。

(4) 重复性

重复检测经标化的企业阳性参考品P3、P4、P12各10次，结果均为相应的染色体非整倍体和片段缺失。重复检测经标化的企业阴性参考品N1 10次，结果应均为未检出试剂盒检测范围内的染色体非整倍体和片段缺失。

(5) 批间差

使用三个不同批次试剂盒检测重复性参考品P3、P4、P12各10次，结果均为相应的染色体非整倍体和片段缺失。使用三个不同批次试剂盒检测重复性参考品N1各10次，结果均为未检出试剂盒范围内的染色体非整倍体和片段缺失。

2. 干扰物质

羊水样本中含有尿素浓度 $\leq 2\text{mg/mL}$ 、肌酐浓度 $\leq 0.2\text{mg/mL}$ 、氯化钠浓度

≤4mg/mL、甘油三酯浓度≤60 mg/L、尿酸浓度≤0.2mg/mL、血红蛋白浓度≤10 mg/mL时，对本试剂盒建库和检测结果无影响。

3. 母体细胞污染

母体细胞污染浓度不高于30%时，不影响该试剂盒对染色体非整倍体和片段缺失的检测。

4. 分析特异性

验证了试剂盒检测范围以外的染色体异常样本（T7、T15、1q21.1del、2p23.1del、2p22.3dup、2q36.3dup、5p15.2del、6q23.3dup、13q32.1del、13q31.1dup、15q11.2dup、17q11.2dup、17p12del、18q12.1del、18p11.21dup、21q22.12del、21q22.3dup、22q11.21del、Xq27.3del、Xp22.31dup、Yq11.223del、Yq11.223dup），包括检测范围内的非整倍体所在染色体的片段缺失、重复样本，检测范围内的染色体片段缺失所在染色体的非整倍体样本，和不在检测范围内染色体上的非整倍体及片段缺失、重复样本，均未检出检测范围内的异常，不影响该试剂盒的分析性能。

5. 检测限

“基因组DNA浓度1.5ng/μL（最低基因组DNA投入量为30ng）水平的20%嵌合度”为本试剂盒对13、18、21、X（女性）染色体非整倍体的最低检测限；“基因组DNA浓度1.5ng/μL（最低基因组DNA投入量为30ng）水平的30%嵌合度”为本试剂盒对XXY、XYY和5种染色体片段缺失的最低检测限。

6. 精密度

两位实验员每天上午、下午分别采用3批试剂盒对阴性、强阳性、临界阳性样本各检测一次，重复20天；另两位实验员在不同实验室使用不同仪器，每天采用1批试剂盒对阴性、强阳性、临界阳性样本各检测一次，重复20天。结果显示符合率为100%。本试剂盒批内/批间、日内/日间、不同地点、不同操作者之间的精密度性能良好，试剂性能稳定。

7. 与临床产前诊断金标准及CMA检测结果的比较

采用本试剂盒对染色体非整倍体异常样本、不同片段大小和不同嵌合比例的染色体片段缺失样本进行检测，与核型分析结果（金标准）或CMA结果比较，阳性符合率为100%，阴性符合率为100%，检测总符合率为100%，Kappa系数为1.00，

表明与临床已知检测结果相比具有很好的一致性。

8. 临床试验

本产品 in 临床试验机构一共完成1377例，与临床参考方法进行对比研究。针对染色体非整倍体变异，与核型分析比较，灵敏度99.25%，特异度100%；针对染色体片段缺失的检测，与染色体微阵列分析（CMA）比较，灵敏度100%，特异度100%。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断；
2. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号）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；
3. 不同批次组分严禁混用；
4. 该试剂盒预期与说明书所推荐的仪器和材料一起使用，其他仪器和材料与本试剂盒一起使用的情况尚未得到验证；
5. 所有试剂从规定的存储环境中取出时，按照要求使用，使用前试剂应摇匀；
6. 样本转移至新离心管时应检查确认标记名称一致；
7. 所有样本及试剂应避免直接接触皮肤和眼睛，切勿吞咽，一旦发生这种情况立即用大量清水冲洗并及时到医院就诊；
8. 检测中所用的离心管、移液器枪头必须保证无脱氧核糖核酸酶活性；所有样本和各种废弃物均视为有潜在的污染，应按污染物进行处理；
9. 检验步骤中配制表均为标准用量，在配制时须考虑损耗；
10. 请严格按照说明书规定的操作步骤进行操作。

【参考文献】

- [1] Donnelly J C , Platt L D , Rebarber A , et al. Association of Copy Number Variants With Specific Ultrasonographically Detected Fetal Anomalies[J]. Obstetrics & Gynecology, 2014, 124(1):83-90.
- [2] Jonathan L. A. Callaway, Lisa G. Shaffer, Lyn S. Chitty,等. The clinical utility of microarray technologies applied to prenatal cytogenetics in the presence of a normal conventional karyotype: a review of the literature[J]. Prenatal Diagnosis, 2013, 33(12).

【基本信息】

注册人/生产企业名称：华大生物科技（武汉）有限公司

住所：武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目
B、C、D 区研发楼 B2 栋

邮编：

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：武汉市东湖新技术开发区高新大道 666 号武汉国家生物产业基地项目
B、C、D 区研发楼 B2 栋五楼、B1 栋一楼

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】