

受理号：CSZ1900374

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：白血病相关15种融合基因检测试剂盒
(荧光RT-PCR法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：苏州云泰生物医药科技有限公司

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.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	14

基本信息

一、申请人名称

苏州云泰生物医药科技有限公司

二、申请人住所

苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 2 栋 606、
608 室

三、生产地址

苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 15 栋 502
室；苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 02 栋 606、
608 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

序号	组份		组份中的主要成分
1	逆转录试剂	MIX 1	随机引物、dNTP、KCl、Tris-HCl、MgCl ₂ 、DTT
2		MIX 2	RT 酶、RNasin、酶稀释液
3	核酸扩增试剂	PCR 反应液 1	引物、荧光探针
4		PCR 反应液 2	引物、荧光探针
5		PCR 反应液 3	引物、荧光探针
6		PCR 反应液 4	引物、荧光探针
7		PCR 反应液 6	引物、荧光探针
8		MIX 3	Taq 酶、UNG 酶、dNTPs、KCl、Tris-HCl、MgCl ₂ 、DTT
9	对照品	阴性对照	工艺用水
10		白血病阳性对照	18 种浓度为 2×10^4 copies/ μ L 的假病毒 RNA 混合液

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测急性髓系白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、以及其他混合表型白血病和前期诊断未明确分型的白血病患者骨髓样本中的BCR-ABL、SIL-TAL1、E2A-HLF、TEL-AML1、MLL-AF4、E2A-PBX1、AML1-ETO、MLL-AF9、PML-RAR α 、MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-ELL、MLL-ENL、CBF β -MYH11和DEK-CAN共15种白血病相关融合基因(其中MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-ELL和MLL-ENL四种融合基因不能鉴别分型)。

本产品用于辅助白血病诊断与分型、临床药物的选择及评估疾病预后。

本产品通过对临床骨髓标本中的白血病相关融合基因的 RNA 逆转录后，对相应的 cDNA 进行定性检测，以确定其融合基因的类型，从而及时辅助白血病临床诊断、临床药物的选择及评估疾病预后提供重要信息。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

(三) 产品包装规格

20测试/盒

(四) 产品检验原理

本产品由白血病相应融合基因特异性引物、荧光探针、RT酶及Taq酶等成分组成，采用核酸扩增技术结合荧光标记探针杂交方法，通过荧光信号的变化，利用荧光标记定性检测人骨髓标本中的白血病相关融合基因RNA的转录产物cDNA。本试剂盒还使用尿苷酶（UNG）防污染体系，经加热可选择性地降解U-DNA，以防止先前PCR扩增产物的污染；采用内参基因（ABL1），控制整个试剂盒检测过程的有效性。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本试剂盒主要原材料包括：本产品在制备过程中主要原材料包括阳性对照原液、引物和探针、Taq酶、UNG酶、RT酶和RNasin酶。其中引物、探针为申请人自行设计后由专业的合成公司合成，阳性对照原液为企业自制，其他原材料均为外购方式获得。申请人选择有资质的供应商提供的原料，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商，并制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

2.企业参考品设置情况

申请人设计了完整的企业参考品，包括准确性参考品、分析特异性参考品、检测限参考品和精密度参考品。其中：

准确性参考品共 28 份，包括检定合格的相应白血病融合基因阳性假病毒或内参基因假病毒，RNA浓度为 3×10^4 copies/ μ L。

分析特异性参考品共3份，包括骨髓细胞裂解物、HL60细胞株裂解物、Jurkat细胞株裂解物各1份，抽提为RNA，RNA浓度为 3×10^4 copies/ μ L。

检测限参考品共18份，包括检定合格的相应白血病融合基因阳性假病毒或内参基因假病毒，抽提为RNA后配制，终浓度为每种RNA 800 copies/ μ L。

精密度参考品共10份，包括检定合格的相应白血病融合基因阳性假病毒或内参基因假病毒，抽提为RNA后配制，高浓度精密度的终浓度为每种RNA 2×10^4 copies/ μ L，低浓度精密度的终浓度

为每种RNA 2×10^3 copies/ μ L。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人对反应体系中的引物、探针的组合；引物浓度、探针浓度；缓冲液的选择；Taq酶、UNG酶用量；退火温度，退火时间，反应循环数，变性温度和时间；样本的上样量，抽提方法的选择；样本提取RNA质量要求；融合基因组检测的设置等进行筛选和优化。通过功能性试验，最终确定了最佳反应体系。

（三）分析性能评估

分析性能包括核酸提取纯化、准确性、精密度、最低检出限、分析特异性（交叉反应和干扰试验）的评估等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品在适用机型上的性能评估资料。

在核酸提取纯化研究中，申请人评价了抽提方法的提取效率、提取RNA浓度的重复性、RNA纯度和抗干扰能力，确定了一种抽提试剂盒与该产品配套使用。

在准确性研究中，申请人检测企业准确性参考品和64例不同融合类型的阳性临床样本结果显示：阳性符合率均为100%。

在分析特异性研究中，申请人检测包括3份企业特异性参考品样本和8例融合基因阴性的临床样本，其阴性符合率为100%。

试剂盒检测6例SET-NUP214、NUP98-HOXA9、TLS-ERG融合基因阳性白血病患者骨髓血样本提取的核酸，其阴性符合率为100%。申请人选择4例融合基因阴性骨髓样本，通过添加的形式，分别研究HBV病毒、CMV病毒、HCV病毒和EBV病毒对检测结果的影响，试验结果显示试剂盒不受上述病原体的影响。干扰试验研究表明，轻度溶血的全血样本（即Hb浓度 $\leq 3\text{g/L}$ ）、重度脂血的全血样本（TG浓度为 20 mmol/L ）、重度黄疸的全血样本（T-Bil含量为 172umol/l ）对检测结果无干扰。2.5倍治疗水平浓度的常见药物和治疗白血病的靶向药物，阿莫西林，阿司匹林、维甲酸、伊马替尼、阿糖胞苷、长春新碱、柔红霉素、亚砷酸、左旋门冬酰胺酶、环磷酰胺和氟达拉滨研究结果显示药物对检测结果无影响。

在精密度研究中，申请人采用三批试剂盒，对各精密度参考品，进行批次内/间、试验日内/间、试验轮次内/间、操作者间、实验室间精密度研究，CV值 $\leq 5\%$ 。试剂盒对18例临床样本进行三批产品的精密度试验，均能检出，且其实验数据CV值 $\leq 5\%$ 。对15例临床样本进行20天精密度试验，从批次内、批次间、不同仪器、试验操作者间、实验室间精密度进行研究，检测结果均能检出，且其实验数据CV值 $\leq 5\%$ 。

在最低检出限研究中，申请人采用相应白血病融合基因阳性样本或内参基因假病毒分别稀释至 10000 copies/反应 、 1000

copies/反应、100 copies/反应确定试剂盒检测限。申请人采用覆盖声称靶基因类型的阳性标本与阴性样本稀释至检测限附近进行最低检出限的验证，结果显示所有样本重复20次，均≥95%检出。

(四) 阳性判断值

申请人采用ROC曲线法确定阳性判断值。申请人采用69个不同融合基因型阳性样本和47个阴性样本进行检测，建立检测试剂的阳性判断值，申请人选取18例白血病相应15种融合基因阳性和10例相应15种融合基因阴性共28例临床诊断结果明确的标本来验证试剂盒的准确性。检测结果显示建立的阳性判断值可以满足试剂盒对于临床样本准确性的要求。

申请人选取125例临床样本，包含覆盖声称靶基因阳性样本、检测融合基因范围外的融合类型阳性样本和融合基因阴性样本。对建立的阳性判断值进行验证。检测结果显示建立的阳性判断值可以满足试剂盒对于临床样本的检测。最终确定以下判读方法：

因不同反应液、不同荧光通道检测不同的融合基因，因此，每个样本在分析中，必须逐一对不同的反应液、同一反应液中的不同通道分别分析，即必须逐一将样本、阳性对照、阴性对照同时分析其在各个反应液中的三种荧光扩增曲线。

表 2 判读方法

反应液融合基因 CT 值**	样本内参 CT 值*	融合基因结果判定
CT 值 ≤ 33	/	阳性（具体相关融合基因见表 5）

33<CT值<35	用已提取的 RNA 重新进行逆转录后，得到的 cDNA 直接对相应可疑反应管和内参管进行 PCR 检测	
	重新进行检测后判定	
	融合基因 CT 值 ≥ 35	阴性或低于最低检出极限
CT 值 ≥ 35	融合基因 CT 值 < 35	阳性（具体相关融合基因见表 5）
	CT 值 ≤ 30	阴性或低于最低检出极限
	CT 值 > 30	加大标本量重新进行抽提后检测
		重新进行检测后判定
重新进行检测后，若样本内参 CT 值 > 30 且反应液融合基因 CT 值 ≥ 35 判定该样本为无效；反之，按上述判定标准判定。		

*样本内参CT值指PCR反应液6 CY5荧光通道CT值。

**反应液融合基因CT值指除PCR反应液6 CY5荧光通道以外其他荧光通道CT值。

若出现阳性结果，具体融合基因型参照下表。

表3 相关融合基因对应表

反应液编号	荧光通道	荧光通道阳性所对应的融合基因
PCR 反应液1	FAM	BCR-ABL
	HEX	SIL-TAL1
	CY5	E2A-HLF
PCR 反应液2	FAM	TEL-AML1
	HEX	MLL-AF4
	CY5	E2A-PBX1
PCR 反应液3	FAM	AML1-ETO
	HEX	MLL-AF9
	CY5	PML-RAR α
PCR 反应液4	HEX	MLL-(AF6、AF10、ELL、ENL)
PCR 反应液6	FAM	CBF β -MYH11
	HEX	DEK-CAN
	CY5	内参 (ABL1)

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、冻融稳定性等进行了研究，

确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。同时，分别对骨髓样本和抽提后的RNA保存条件、冻融时间及冻融次数进行了研究确定了临床样本的保存条件。

实时稳定性研究：将三批试剂盒在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中储存0、10、15、18个月后分别进行一次成品检验，结果表明试剂盒在常规储存条件下18个月后检测结果均符合技术要求，故本试剂盒常规稳定性定为：储存条件 $-20^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ ，储存18个月。

冻融次数研究：使用一批试剂盒进行开盖试验，具体操作流程如下：在 $-20^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放的试剂盒2盒，每5天左右拿出一次，将试剂完全融解后，将试剂完全融解，开盖2分钟后再盖好盖子，放回 $-20^{\circ}\text{C}\pm 4^{\circ}\text{C}$ 冰箱中存放，每5天左右重复一次，连续5次，1个月后进行检定，试剂盒准确性、特异性、检测限性能稳定，因此将试剂盒开盖、反复冻融条件定为：有效期内反复冻融4次，性能稳定。

三、临床评价概述

申请人在苏州大学附属第一医院、浙江大学医学院附属第一医院、上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心和首都医科大学附属北京儿童医院共四家临床试验机构完成了临床试验。采用试验体外诊断试剂与染色体核型分析、Sanger测序法以及已上市同类产品分别进行比较研究，对产品临床性能进行评价。入组病例主要包括急性髓系白血病、急性淋巴细胞白血病和慢性粒细胞

白血病等血液病患者，样本类型为骨髓样本。临床试验共入组受试者样本1103例，包括74例核型分析失败患者样本，其中融合基因阳性样本639例，阴性样本464例；融合基因阳性样本中包括BCR-ABL阳性172例、AML1-ETO阳性100例、PML-RAR α 阳性100例、E2A-HLF阳性9例、MLL-AF4阳性30例、SIL-TAL1阳性16例、E2A-PBX1阳性22例、TEL-AML1阳性50例、CBF β -MYH11阳性40例、DEK-CAN阳性16例、MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-ELL、MLL-ENL联合检测阳性61例、MLL-AF9阳性23例。

经统计核验，试验体外诊断试剂与染色体核型分析对比，临床灵敏度为99.76%（95%CI: 98.63%，99.96%），临床特异度为74.56%（95%CI: 70.99%，77.82%），不一致样本采用Sanger测序法复核，并结合临床分子分型结果进行分析，测序结果以及临床分子分型结果与试验体外诊断试剂检测结果100%一致。分析原因，不一致结果主要是因为染色体核型分析检测融合基因灵敏度偏低导致。74例核型分析失败样本检测结果，试验体外诊断试剂与Sanger测序法检测结果符合率100%。

试验体外诊断试剂与Sanger测序法对比试验结果显示，两种方法针对每一种被测融合基因检测阳性符合率、阴性符合率均为100%；收集临床机构针对受试者的分子分型诊断结果，试验体外诊断试剂针对被测融合基因检测结果与临床机构分子分型诊断结果100%一致。

试验体外诊断试剂与BCR-ABL、AML1-ETO、PML-RAR α 已上市同类产品对比试验分别检测临床样本200例，结果显示，BCR-ABL阳性符合率100%（95%CI: 90.36%，100%），阴性符合率100%（95%CI: 97.71%，100%）；AML1-ETO阳性符合率100%（95%CI: 92.44%，100%），阴性符合率100%（95%CI: 97.55%，100%）；PML-RAR α 阳性符合率100%（95%CI: 91.24%，100%），阴性符合率100%（95%CI: 97.66%，100%）。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求。临床试验结果显示该产品临床灵敏度、临床特异度满足临床要求。

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，认为该产品的上市为适用人群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，需在说明书中提示以下信息：

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类体外诊断试剂产品注册，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 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 2 月 24 日

附件：产品说明书

白血病相关 15 种融合基因检测试剂盒（荧光 RT-PCR 法）

使用说明书

【产品名称】

白血病相关 15 种融合基因检测试剂盒（荧光 RT-PCR 法）

【包装规格】

20 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测急性髓系白血病(AML)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、以及其他混合表型白血病和前期诊断未明确分型的白血病患者骨髓样本中的 BCR-ABL、SIL-TAL1、E2A-HLF、TEL-AML1、MLL-AF4、E2A-PBX1、AML1-ETO、MLL-AF9、PML-RAR α 、MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-ELL、MLL-ENL、CBF β -MYH11 和 DEK-CAN 共 15 种白血病相关融合基因（其中 MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-ELL 和 MLL-ENL 四种融合基因不能鉴别分型）。

本产品用于辅助白血病诊断与分型、临床药物的选择及评估疾病预后。

白血病是国内十大高发恶性肿瘤之一，近年临床研究表明，大部分白血病和淋巴瘤存在某些染色体畸变，如易位、缺失、插入等。染色体易位畸变时大部分情况下形成相关的融合基因。一些典型的白血病融合基因是某种白血病的特异性分子诊断标志，可以作为该类白血病的诊断标准：如 1) 部分急性淋巴细胞白血病：染色体 t(9;22)(q34;q11) 易位形成 BCR-ABL 融合基因；2) 急性早幼粒细胞白血病 APL：染色体 t(15;17)(q21;q22) 易位形成 PML-RARA 融合基因；3) 急性髓细胞白血病 AML-M4Eo：染色体 inv(16)(p13;q22) 形成 CBF β -MYH11 融合基因；4) 急性髓细胞白血病 AML-M2b：染色体 t(8;21)(q22;q22) 形成 AML1-ETO 融合基因等。在《2016 版 WHO 造血与淋巴组织肿瘤分类》的新分类中明确融合基因是白血病诊断中的关键，对于具有特定克隆性染色体或基因学标记的患者，即便骨髓和血液中原始细胞比例未达 20%，也可诊断为 AML。

染色体易位和融合基因在白血病危险度分级中占有重要地位，如在《成人急性髓系白血病（非急性早幼粒细胞白血病）中国诊疗指南（2017 年版）》将 inv(16)(p13;q22) 或 t(16;16)(p13;q22) 形成 CBF β -MYH11 融合基因，t(8;21)(q22;q22) 形成 AML1-ETO 融合基因，t(9;11)(p22;q23) 形成 MLL-AF9 融合基因；t(15;17)(q21;q22) 易位形成 PML-RARA 融合基因，t(6;9)(p23;q34) 易位形成 DEK-CAN 融合基因，t(9;22)(q34;q11) 易位形成 BCR-ABL 融合基因，11q23 染色体易位形成的 MLL 相关融合基因等列入了判断急非淋预后危险度分级的分子标志。在《中国成人急性淋巴细胞白血病诊断与治疗指南(2016 年版)》和《儿童急性淋巴细胞白血病诊疗建议（第四次修订）》将 t(12;21)(p13;q22) 易位形成 TEL-AML1 融合基因，t(9;22)(q34;q11) 易位形成 BCR-ABL 融合基因，t(4;11)(q21;q23) 形成 MLL-AF4 融合基因，t(1;19)(q23;p13) 形成 E2A-PBX1 融合基因等列入了判断急淋预后危险度分级的分子标志。

本产品通过对临床骨髓标本中的白血病相关融合基因的 RNA 逆转录后，对相应的 cDNA 进行定性检测，以确定其融合基因的类型，从而及时辅助白血病临床诊断、临床药物的选择及评估疾病预后提供重要信息。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

【检测原理】

本产品由白血病相应融合基因特异性引物、荧光探针、RT 酶及 Taq 酶等成分组成，采用核酸扩增技术结合荧光标记探针杂交方法，通过荧光信号的变化，利用荧光标记定性检测人骨髓标本中的白血病相关融合基因 RNA 的转录产物 cDNA。本试剂盒还使用尿苷酶（UNG）防

污染体系，经加热可选择性地降解 U-DNA，以防止先前 PCR 扩增产物的污染；采用内参基因（ABL1），控制整个试剂盒检测过程的有效性。

【主要组成成分】

1. 主要组成成分

序号	组份	组份中的主要成分	标识量	数量	
1	逆转录试剂	MIX 1 随机引物 (0.01~0.05 μ M)、dNTP (20~200 μ M)、KCl (300~400 mM)、Tris-HCl (200~300 mM)、MgCl ₂ (10~20 mM)、DTT (40~60 mM)	120 μ L	1 管	
2		MIX 2 RT 酶、RNasin、酶稀释液	80 μ L	1 管	
3	核酸扩增试剂	PCR 反应液 1 引物 (0.1~0.3 μ M)、荧光探针 (0.05~0.15 μ M)	140 μ L	1 管	
4		PCR 反应液 2 引物 (0.1~0.3 μ M)、荧光探针 (0.05~0.15 μ M)	140 μ L	1 管	
5		PCR 反应液 3 引物 (0.1~0.3 μ M)、荧光探针 (0.05~0.15 μ M)	140 μ L	1 管	
6		PCR 反应液 4 引物 (0.1~0.3 μ M)、荧光探针 (0.05~0.15 μ M)	140 μ L	1 管	
7		PCR 反应液 6 引物 (0.1~0.3 μ M)、荧光探针 (0.05~0.15 μ M)	140 μ L	1 管	
8		MIX 3 Taq 酶、UNG 酶、dNTPs (20~200 μ M)、KCl (适量)、Tris-HCl (适量)、MgCl ₂ (1.0~4.0 mM)、DTT (适量)	780 μ L	2/管	
9	对照品	阴性对照 (为工艺用水)	工艺用水	400 μ L	1 管
10		白血病阳性对照	18 种浓度为 2×10^4 copies/ μ L 的假病毒 RNA 混合液	150 μ L	1 管

各反应液所检测的具体融合基因类型见附表。

2. 不同批号试剂盒中各组分不得互换使用。

3. 白血病阳性对照为相应基因片段的假病毒 RNA 混合液，阴性对照为工艺用水。

4. 需要但未提供的试剂：

DEPC 水；

Trizol 方法抽提 RNA 使用上海源奇生物医药科技有限公司生产的“核酸提取及纯化试剂”（货号：W061）。

产品名称	备案号	型号规格	备案人名称
核酸提取及纯化试剂	沪奉械备 20210068 号	W061/50 测试/盒	上海源奇生物医药科技有限公司

*含工艺用水。

5. 阴性对照各 PCR 反应液的 C_T 值均应 ≥ 35 或显示“Undet”。

【适用仪器】

ABI PRISM7500、Bio-Rad Deep Well Dx CFX96

【储存条件及有效期】

储存条件：-20 $^{\circ}$ C \pm 4 $^{\circ}$ C 条件下避光保存。

冰袋低温运输不超过 4 天，温度为 -20 $^{\circ}$ C~13 $^{\circ}$ C 的条件，抵达目的地后，-20 $^{\circ}$ C \pm 4 $^{\circ}$ C 条件下避光保存。有效期内反复冻融 4 次，性能稳定。

有效期：18个月。

生产日期、有效期至：见标签。

【样本要求】

骨髓样本采集：本试剂盒适用于枸橼酸钠抗凝剂或 EDTA 抗凝剂的抗凝骨髓样本。

骨髓样本处理及保存：取枸橼酸钠抗凝剂或 EDTA 抗凝剂的标本 0.5ml（保存时限 4℃ 不超过 24 小时）经去除红细胞处理，收集有核细胞，按 3 倍体积量加入 Trizol 混匀，临时存放 4℃ 不超过 24 小时，短期于 -20℃ 保存不超过 1 年，冻融不超过 5 次。长期于 -80℃ 保存不超过 10 年。

样本运输：保存在 Trizol 中的样本或提取完的 RNA 或 cDNA 运输时，应放置在加冷冰袋的泡沫箱内低温运输，运输时间不应超过 5 天。

抽提 RNA 要求：使用 Trizol 方法抽提。提取完的 RNA 建议立即进行检测，否则临时存放 4℃ 不超过 3 天，短期于 -20℃ 以下保存不超过 1 年，冻融不超过 5 次。长期于 -80℃ 保存不超过 10 年。

样本要求：进入逆转录体系 RNA 的量应大于 1 μ g。

【检验方法】

1. 样本 RNA 提取：

① 取保存在 Trizol 里的标本，加入等体积氯仿，混匀，室温放置 5 分钟。15000 rpm 离心 10 分钟，离心后吸取无色上清液。

② 在上述上清中加入等体积预冷的异丙醇，颠倒混匀后室温放置 10 分钟。15000 rpm 离心 10 分钟，吸弃上清。

③ 在上述离心管中，加入 300 μ L 预冷的 70% 乙醇，15000 rpm 离心 5 分钟，吸弃上清。室温 10 分钟，使乙醇挥发。

加入 50 μ L DEPC 水混匀溶解，以此作为后续试验的模板。

2. RNA 样本逆转录：

从试剂盒中取出 MIX1 及 MIX2，室温融化并振荡混匀后，短暂离心数秒，将上述提取的样本 RNA，1 人份逆转录按如下配制：6 μ L MIX1+4 μ L MIX2（PCR 管数应为样本数、1 个阴性对照及 1 个白血病阳性对照之和）。从样本（包括阴性对照、阳性对照）RNA 液中取 10 μ L，加至装有上述相应 PCR 预混液的 PCR 管中，盖紧管盖、将其移至检测区。

逆转录条件设定

37℃ 1 个小时；70℃ 10 分钟（可使用普通 PCR 扩增仪）

逆转录后的 cDNA，作为后续扩增的模板。

3. 扩增试剂准备：

从试剂盒中取出各种反应液及 MIX3，室温融化并振荡混匀后，短暂离心数秒，各 PCR 反应液体系 1 人份均按如下配制：7 μ L PCR 反应液+13 μ L MIX3（PCR 管数应为样本数、1 个阴性对照及 1 个白血病阳性对照之和）。

将上述配制好的 PCR 预混液，分别按每管 20 μ L 的量，分装于各 PCR 管内。

cDNA 液的配制：在经转录后的 cDNA 中加入工艺用水至 40 μ L 并混匀。

4. 加样：

从样本（包括阴性对照、阳性对照）cDNA 液中分别取 5 μ L，加至装有上述相应 PCR 预混液的 PCR 管中，盖紧管盖、将其移至检测区。具体如下：

反应液名称	PCR 反应液 1	PCR 反应液 2	PCR 反应液 3	PCR 反应液 4	PCR 反应液 6
各 PCR 反应液取量	7 μ L				
MIX 3 取量	13 μ L				
模板（阴性、阳性、样本 cDNA 液）取	5 μ L				

量					
反应总体积	25 μ L				

5. PCR扩增:

5.1 扩增条件设定

机型	扩增条件
ABI PRISM 7500 Bio-Rad CFX96 Deep Well Dx	预变性: 42 $^{\circ}$ C, 5 min; 95 $^{\circ}$ C, 10 min; PCR 循环: (94 $^{\circ}$ C, 15 sec; 60 $^{\circ}$ C, 60 sec) 40 个循环。 在 PCR 循环第二步 60 $^{\circ}$ C 时收集荧光信号

反应体系为25 μ L。

5.2 检测通道设定

机型	检测通道 (同时设定)
ABI PRISM 7500	FAM-TAMRA、CY5-TAMRA 和 VIC-TAMRA
Bio-Rad CFX96 Deep Well Dx	FAM、CY5 和 VIC/HEX(VIC 和 HEX 为相同测定波长, 所以任选其一)

5.3 参比荧光设定

机型	参比荧光设定
ABI PRISM 7500	none
Bio-Rad CFX96 Deep Well Dx	/

6. 检测:

(1) 基线的确定: 软件默认设定 3-15 个循环的平均荧光信号为基线。在实验中, 一般选择曲线波动较小, 较稳定的那段作为基线, 用户可根据实际情况自行酌情调整。起点要避免开始几个循环由于高温导致的信号增高, 设在信号已经降到背景高度且能维持平稳的地方, 终点要避免覆盖信号已经开始有明显增长的地方。依据实验曲线走势的不同, 一般 start 值可选择在 3-12 之间; stop 值选择以起点与终点之间最好能间隔 8 个循环以上为原则, 以更好满足统计基线标准偏差的数学要求。

(2) 阈值的确定: 在阴性对照无扩增的情况下, 阈值设定在无扩增曲线样本的最高点, 即高于无扩增增长曲线 (即在结果分析 “Component” 栏中无拐点出现) 的最高点, 且阴性对照未检出为原则, 确定起始阈值。

【阳性判断值及检验结果的解释】

1、有效性判定: 试剂盒相关组份必须符合下列要求, 否则视为实验无效。

反应液名称	PCR 反应液 1	PCR 反应液 2	PCR 反应液 3	PCR 反应液 4	PCR 反应液 6
阴性对照 (C_T 值)	大于或等于 35 或显示 “Undet”				
阳性对照 (C_T 值)	小于或等于 33				

2、结果判定:

因不同反应液、不同荧光通道检测不同的融合基因, 因此, 每个样本在分析中, 必须逐一不同的反应液、同一反应液中的不同通道分别分析, 即必须逐一将样本、阳性对照、阴性对照同时分析其在各个反应液中的三种荧光扩增曲线。

反应液融合基因 C_T 值**	样本内参 C_T 值*	融合基因结果判定
C_T 值 \leq 33	/	阳性 (具体相关融合基因见附表)
$33 < C_T$ 值 $<$ 35	/	用已提取的 RNA 重新进行逆转录后, 得到的 cDNA 直接对相应可疑反应管和内参管进行 PCR 检测

		重新进行检测后判定	
		融合基因 C _T 值≥35	阴性或低于最低检出极限
		融合基因 C _T 值<35	阳性（具体相关融合基因见附表）
C _T 值≥35	C _T 值≤30	阴性或低于最低检出极限	
	C _T 值>30	加大标本量重新进行抽提后检测	
		重新进行检测后判定	
		重新进行检测后，若样本内参 C _T 值>30 且反应液融合基因 C _T 值≥35 判定该样本为无效；反之，按上述判定标准判定。	

*样本内参 C_T 值指 PCR 反应液 6 CY5 荧光通道 C_T 值。

**反应液融合基因 C_T 值指除 PCR 反应液 6 CY5 荧光通道以外其他荧光通道 C_T 值。

若出现阳性结果，具体融合基因型参照下表。

反应液编号	荧光通道	荧光通道阳性所对应的融合基因
PCR 反应液1	FAM	BCR-ABL
	HEX	SIL-TAL1
	CY5	E2A-HLF
PCR 反应液2	FAM	TEL-AML1
	HEX	MLL-AF4
	CY5	E2A-PBX1
PCR 反应液3	FAM	AML1-ETO
	HEX	MLL-AF9
	CY5	PML-RAR α
PCR 反应液4	HEX	MLL- (AF6、AF10、ELL、ENL)
PCR 反应液6	FAM	CBF β -MYH11
	HEX	DEK-CAN
	CY5	内参 (ABL1)

【产品性能指标】

- 1、试剂盒外观：试剂盒外观完好，各管封闭性能良好，无渗漏，标识清晰，装量准确。
- 2、试剂盒检测 28 份准确性参考品样本及 64 例不同融合类型的阳性临床样本，其阳性符合率为 100%。
- 3、试剂盒检测 3 份特异性参考品样本，其阴性符合率为 100%。试剂盒检测 6 例 SET-NUP214、NUP98-HOXA9、TLS-ERG 融合基因阳性白血病患者骨髓血样本提取的核酸，其阴性符合率为 100%。常见的病原体，如 HBV 病毒、CMV 病毒、HCV 病毒和 EBV 病毒对检测结果无影响。轻度溶血的全血样本（即 Hb 浓度≤3g/L）、重度脂血的全血样本（TG 浓度为 20 mmol/L）、重度黄疸的全血样本（T-Bil 含量为 172 μ mol/l）均可以使用本试剂盒进行检测，对结果无干扰。通过向骨髓血样本中添加 2.5 倍治疗水平浓度的常见药物和治疗白血病的靶向药物，如阿莫西林，阿司匹林、维甲酸、伊马替尼、阿糖胞苷、长春新碱、柔红霉素、亚砷酸、左旋门冬酰胺酶、环磷酰胺和氟达拉滨研究结果显示药物对检测结果无影响。
- 4、试剂盒检测 18 份检测限参考品样本，均能检出。试剂盒检测 84 例不同融合类型，稀释至 1000 拷贝/反应的临床样本，重复 20 次，检出率≥95%。
- 5、试剂盒检测 10 份精密度参考品样本，在相应的反应液中重复做 10 次，均能检出，且其实验数据 CV 值≤5%。试剂盒对 18 例临床样本进行 3 批产品的精密度试验，均能检出，且其实验数据 CV 值≤5%。试剂盒对 15 例临床阳性样本进行 20 天精密度试验，从批次内、批次间、不同仪器、试验操作者间、实验室间等维度进行研究，检测结果均能检出，且其实验数据 CV 值

≤5%。

6、本产品临床试验纳入白血病患者及部分其他血液病患者的骨髓样本共计 1103 例。采用本产品与染色体核型分析进行对比试验结果显示：本产品与对照方法的阳性符合率 99.76%，阴性符合率 74.56%，总符合率 84.47%；对不一致的样本采用 Sanger 测序法进行验证，结果显示，Sanger 测序法检测结果与本产品完全一致。采用本产品与 Sanger 测序法进行对比试验，阳性符合率 100.00%，阴性符合率 100.00%，总符合率 100.00%。采用本产品与 BCR-ABL、PML-RAR α 、AML1-ETO 已上市的同类产品进行一致性对比，阳性符合率 100.00%，阴性符合率 100.00%，总符合率 100.00%。

【检验方法的局限性】

- 1.本试剂盒不能检出未包含的人类白血病融合基因型别（检测型别见附表）。因此，当检测结果为阴性时，并不能排除被检测者带有本试剂盒未涉及的其他融合基因或包含的融合基因未设计的检测位点。
- 2.本试剂盒的检测结果仅对患者的融合基因型进行了检测，检测的结果不能作为患者诊断的唯一证据，临床医生应结合患者的其他实验室检测指标以及患者本身的状况进行综合判断。
- 3.本试剂盒检测原理为实时荧光 RT-PCR 法，检测人员需经过 PCR 实验技能培训，检测环境符合说明书“**注意事项**”第一条要求，且试剂盒阴性对照需符合说明书“**有效性判定**”。

【注意事项】

- 1、因 FQ-PCR 为高灵敏度的实验，需严格按照 PCR 实验室的操作规范分区操作，并注意防污染。实验室应分为试剂准备区、标本制备区、扩增及产物分析区共三个区，工作人员一旦进入各个工作区域进行工作时，应严格遵守从“试剂准备区→标本制备区→扩增及产物分析区”的单一流向制度，不得逆入前一工作区。各工作区有专用的仪器设备、办公用品、工作服、实验耗材和清洁用具等，各区不可混用。并应严格区分阳性参考品和反应试剂的使用，使用一次性耗材，防止污染试剂，造成假阳性；在操作时戴好口罩、手套，选用 RNase-free 枪头和离心管，以避免提取过程中 RNA 被 RNase 降解，造成假阴性。
- 2、本试剂盒所有试剂均经过特别配制，随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果。不同批号试剂盒成分不可相互混用。
- 3、本试剂盒检测标本为临床抗凝骨髓标本，操作者均应将之视为潜在传染源，并严格按照生物制品安全操作规范操作。实验完毕用消毒剂处理工作台及相应的器具。
- 4、本试剂盒需低温运输，抵达目的地后应-20℃冷冻保存，并尽量避免反复冻融，试剂解冻后请混匀使用。
- 5、本品仅用于体外诊断，测试结果仅供辅助诊断，对实验结果的解释需与临床相结合。
- 6、鉴于 PCR 技术要求的特殊性、复杂性，实验室人员应为有经验的医学检验专业人员，并应参加卫生部或省临检中心举办的 PCR 技术培训，且取得合格证后方可上岗。

【标识的解释】

无

【参考文献】

- [1]J Gabert, E Beillard, VHJ van der Velden et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. Leukemia, 2003, 17, 2318–2357
- [2]EN375-2001 Information supplied by the manufacturer with in vitro diagnostic reagents for professional use
- [3]EN980-2003 Graphical symbols for use in the labelling of medical devices
- [4]EN13641-2002 Elimination or reduction of risk of infection related to in vitro diagnostic reagents
- [5]EP9-A2 Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline—Second Edition, NCCLS, 2002

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州云泰生物医药科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 2 栋 606、608 室

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 15 栋 502 室；苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 02 栋 606、608 室

医疗器械生产企业许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2014 年 2 月 修改日期：2021 年 08 月

附表:

反应液	荧光通道	融合基因
PCR 反应液 1	FAM	BCR-ABL
	HEX	SIL-TAL1
	CY5	E2A-HLF
PCR 反应液 2	FAM	TEL-AML1
	HEX	MLL-AF4
	CY5	E2A-PBX1
PCR 反应液 3	FAM	AML1-ETO
	HEX	MLL-AF9
	CY5	PML-RARa
PCR 反应液 4	HEX	MLL-AF6、MLL-AF10、MLL-ELL、MLL-ENL
PCR 反应液 6	FAM	CBFB-MYH11
	HEX	DEK-CAN
	CY5	ABL1 内参基因