

受理号: CSZ2300427

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称: 尿路上皮癌相关8种基因检测试剂盒（PCR荧光探针法）

产品管理类别: 第三类

申请人名称: 杭州可帮基因科技有限公司

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	6
三、 临床评价概述	10
四、 产品受益风险判定	11
综合评价意见	14

基本信息

一、 申请人名称

杭州可帮基因科技有限公司

二、 申请人住所

浙江省杭州市临平区余杭经济技术开发区新颜路22号7幢
301M

三、 生产地址

杭州市临平区龙船坞路157号3幢5层502室； 杭州市临平区龙
船坞路157号5幢3层1309、1310室

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表1：

表1 试剂盒主要组成成分

编号	组分名称	主要成分	数量
1	逆转录预混试剂	逆转录引物、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)	1管(110μL/管)
2	逆转录酶预混液	RNA依赖性DNA聚合酶	1管(55μL/管)
3	PCR扩增预混液	DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、Mg ²⁺	1瓶(2.5mL/瓶)
4	探针引物预混条	PCR扩增引物、荧光探针	24条 (4μL/孔, 1测试/条)
5	阳性对照品	人源膀胱癌细胞系总RNA	1管(14μL/管)
6	阴性对照品	正常细胞总RNA	1管(14μL/管)
7	稀释液	无核酸酶水	1瓶(1.5mL/瓶)

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尿液脱落细胞样本中编码RNA CA9、CCL18、ERBB2、IGF2、MMP12、PPP1R14D、SGK2和非编码RNA SWINGN共8种尿路上皮癌相关基因的表达水平。

本产品用于疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断。

本产品采用荧光PCR方法对上述8个基因的表达水平进行检测，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镜检的辅助诊断，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他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

24测试/盒。

（四）产品检验原理

本产品检验原理主要包括RNA提取、逆转录及荧光定量PCR三个步骤。

通过核酸提取试剂提取尿液脱落细胞中的RNA进行逆转录反应产生cDNA。

采用双重PCR分别检测8个尿路上皮癌相关靶基因，每个反应管分别检测1个靶基因和人源管家基因（GAPDH）的表达水平，通过 ΔCt 值反映细胞中8个靶基因的表达水平。人源管家基因GAPDH作为内部参照（以下简称内参，Internal Control（IC））系统，对样本RNA提取、逆转录和PCR反应过程进行质量控制，其Ct值参与计算。

本产品利用特异性的引物对8个尿路上皮癌相关基因及内标基因GAPDH进行PCR扩增，并通过TaqMan探针对扩增产物进行检测，在实时荧光PCR平台上获取样本尿路上皮癌相关基因的表

达Ct值。采用《尿路上皮癌基因分析软件》对待测样本的各基因表达Ct值进行分析，计算样本的综合评分，获得分析结果。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

该产品的主要原材料包括引物、探针、dNTP、DNA聚合酶及对照品等。其中对照品为申请人自行生产，其他原材料均通过外购的方式获得。

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. 企业参考品和对照品的设置情况

该产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性参考品，均由临床样本制备而成。

阳性参考品：8份，来源于试剂盒涵盖的不同临床分期和病理分级的尿路上皮癌样本。阴性参考品：5份，来源于试剂盒检测范围外的其他泌尿系统良恶性疾病样本。检测限参考品：2份，分别为产品检出限参考品和基因表达检出限参考品。重复性参考品：4份，包含弱阳性、强阳性浓度水平的产品重复性参考品和基因表达重复性参考品。基因表达检出限参考品和重复性参考品均由临床尿路上皮癌RNA样本经逆转录得到cDNA后，采用数字

PCR方法测定拷贝数后进行制备而成；其余参考品均由临床样本提取的RNA制备而成。

该试剂盒同时设置了阳性对照和阴性对照，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，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、PCR扩增预混液用量、逆转录酶和逆转录预混试剂用量的确定等；对反应条件的研究包括逆转录反应程序、PCR反应程序和基线的确定等；对样本采集处理、样本保存时间、样本用量和核酸提取进行了研究。

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、分析特异性（交叉反应和干扰物质研究）、检出限和精密度。

1. 准确度研究

在准确度研究中，申请人收集了若干例经临床确诊为尿路上皮癌或泌尿系统其他良恶性疾病的临床样本，进行真实临床样本的阳性/阴性符合率的测试，以评估产品检测的准确度。测试结

果符合要求。

2.分析特异性

分析特异性研究采用三批次试剂盒进行了交叉反应和干扰物质研究。

在交叉反应研究中，申请人对临床确诊为非尿路上皮癌的样本，包括泌尿系统良性病变和其他泌尿系统恶性肿瘤；以及对靶基因的同源序列进行检测，结果均显示申报产品无交叉反应。

在干扰物质研究中，申请人对18种与尿液相关的内源和外源性潜在干扰物质（血、葡萄糖、蛋白质、乙醇、氯化钠、血红蛋白、左氧氟沙星、布洛芬、维生素C、大肠杆菌、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、淋球菌、解脲脲原体、丝裂霉素、吡柔比星、吉西他滨、卡介苗）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对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。

3.检出限研究

检出限研究包括产品检出限和基因表达检出限研究。申请人采用多例样本和多批试剂分别进行了建立和验证研究，建立确定产品检出限为RNA浓度不高于6.5ng/μL，基因表达检出限为不高于40拷贝/μL；并使用三批次试剂盒进行验证，均符合要求。

4.精密度

在精密度研究中，申请人采用三批次试剂盒对不同的临床样

本进行连续检测，统计其检测结果，并对批内、批间、日内、日间、不同操作者以及实验室间精密度等进行了评价。研究结果表明，各基因扩增Ct值的变异系数CV均不高于5%，检测结果（综合评分）的变异系数CV均不高于15%。

对三批次试剂盒采用企业强阳性产品重复性参考品和弱阳性产品重复性参考品进行重复性检测，每批试剂盒每份参考品重复检测10次，检测结果均一致。

对三批次试剂盒采用企业强阳性基因表达重复性参考品和弱阳性基因表达重复性参考品进行重复性检测，每批试剂盒每份参考品重复检测10次，每个靶基因的Ct值变异系数CV均不高于5%。

（四）阳性判断值研究

本研究分为阳性判断值的建立和验证两部分。纳入的阳性病例120例，包括膀胱尿路上皮癌、肾盂尿路上皮癌和输尿管尿路上皮癌；阴性病例共纳入192例，包括泌尿系统良性病变、泌尿系统其他肿瘤等，共计312例。

本产品根据各基因检测结果Ct值，使用《尿路上皮癌基因分析软件》计算分析获得样本的综合评分。采用ROC曲线分析对综合评分进行分析，确定本产品的阳性判断值：综合评分50；然后再采用验证集进行独立样本验证，确认本试剂盒的阳性判断值设置合理。

（五）稳定性研究

申请人对产品的货架稳定性（实时稳定性）、运输稳定性和使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性）及样本稳定性进行了研究。

货架有效期稳定性：将三批次试剂盒置于规定储存条件下保存，分别于不同时间点领取完整包装的试剂盒，使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果表明试剂盒产品有效期为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，产品的性能均满足产品说明书的声称。

三、 临床评价概述

申请人在复旦大学附属肿瘤医院、浙江省人民医院、浙江大学医学院附属邵逸夫医院3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，尿路上皮癌和其他恶性肿瘤病例采用病理诊断确诊，其他疾病根据相关诊疗指南进行综合诊断确诊。入组病例包括：有血尿、膀胱刺激症等临床症状的病例，或经影像学等非侵入性方法显示异常，临床需进一步检查的疑似尿路上皮癌初诊患者，以及经影像学等非侵入性方法无法决策是否进行镜检的病例。样本类型为尿液。

临床试验共纳入临床有效病例955例，其中尿路上皮癌病例338例（覆盖尿路上皮癌的所有分期及病理分型），非尿路上皮癌的其他病例617例（包括其他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95.86%（95%CI：93.17%-97.52%），临床特异度为94.49%（95%CI：92.40%-96.03%），总符合率为94.97%（95%CI：93.40%-96.19%）。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，采用试验体外诊断试剂对41例尿路上皮癌患者手术前后的样本进行监测，41例样本术前检测结果为阳性，其中39例术后检测结果为阴性；2例术后检测结果仍为阳性。结果表明尿路上皮癌患者手术切除后尿液中mRNA水平降低。

综上所述，临床试验结果显示该产品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》及其内部质量管理体系规定执行风险管理相关活动，对该产品进行受益风险判定。

（一）受益评估

本产品采用荧光PCR方法对上述8个基因的表达水平进行检测，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镜检的辅助诊断，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他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

临床应用的主要受益为：该产品为临床上疑似尿路上皮癌患者提供了一种辅助诊断方法的选择。依据现有的临床试验结果，其对尿路上皮癌的诊断性能与临床参考标准相比，具有较好的一致性，可满足临床应用基本要求。

（二）风险评估

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险，不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。

尽管目前认为该试剂盒的受益大于风险，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

本产品采用荧光PCR方法对上述8个基因的表达水平进行检

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镜检的辅助诊断，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他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验方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

依据《医疗器械监督管理条例》（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材料进行系统评价，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。

2025年6月11日

附件：产品说明书

尿路上皮癌相关8种基因检测试剂盒（PCR荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：尿路上皮癌相关8种基因检测试剂盒（PCR荧光探针法）

【包装规格】

24测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人尿液脱落细胞样本中编码RNA CA9、CCL18、ERBB2、IGF2、MMP12、PPP1R14D、SGK2和非编码RNA SWINGN共8种尿路上皮癌相关基因的表达水平。

本产品用于疑似尿路上皮癌初诊患者的辅助诊断。

本产品采用荧光PCR方法对上述8个基因的表达水平进行检测，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镜检的辅助诊断，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他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

尿路上皮癌相关靶基因具体包括编码RNA CA9、CCL18、ERBB2、IGF2、MMP12、PPP1R14D、SGK2和非编码RNA SWINGN，其中基因CA9、IGF2、MMP12和PPP1R14D在尿路上皮癌细胞中相对高表达，基因CCL18、ERBB2、SGK2和SWINGN在尿路上皮癌细胞中相对低表达。

尿路上皮癌是世界上最常见的癌症之一，占我国泌尿生殖系肿瘤发病率的第一位^[1]。目前尿路上皮癌的诊断主要依靠尿脱落细胞学检查和膀胱镜/输尿管镜检查等。尿液中检测出癌细胞是尿路上皮癌的定性诊断之一。尿脱落细胞学检查的特异度高，但敏感度较低^[2]。内镜检查是诊断尿路上皮癌最可靠的方法，但是内镜检查是侵入性检查，不仅会造成患者严重的不适，还可能造成感染和创伤^[2, 3]。随着测序和芯片技术的发展，研究表明，肿瘤细胞脱落到尿液中的高频率以及基因表达谱的信息性，通过尿液样本进行RNA表达谱检测可用于尿路上皮癌的检测^[4]。

【检验原理】

本产品检验原理主要包括RNA提取、逆转录及荧光定量PCR三个步骤。

通过核酸提取试剂提取尿液脱落细胞中的RNA进行逆转录反应产生cDNA。

采用双重PCR分别检测8个尿路上皮癌相关靶基因，每个反应管分别检测1个靶基因和人源管家基因（GAPDH）的表达水平，通过 ΔCt 值反映细胞中8个靶基因的表达水平。人源管家基因GAPDH作为内部参照（以下简称内参，Internal Control（IC））系统，对样本RNA提取、逆转录和PCR反应过程进行质量控制，其Ct值参与计算。

本产品利用特异性的引物对8个尿路上皮癌相关基因及内标基因GAPDH进行PCR扩增，并通过TaqMan探针对扩增产物进行检测，在实时荧光PCR平台上获取样本尿路上皮癌相关基因的表达Ct值。采用《尿路上皮癌基因分析软件》对待测样本的各基因表达Ct值进行分析，计算样本的综合评分，获得分析结果。



图1 检测流程图

【主要组成成分】

1. 本试剂盒主要组成及组分如下：

表1 试剂盒组成及组分表

编号	组分名称	主要成分	数量
1	逆转录预混试剂	逆转录引物、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）	1管（110μL/管）
2	逆转录酶预混液	RNA依赖性DNA聚合酶	1管（55μL/管）

3	PCR扩增预混液	DNA聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP）、 Mg^{2+}	1瓶（2.5mL/瓶）
4	探针引物预混条	PCR扩增引物、荧光探针	24条 （4μL/孔，1测试/条）
5	阳性对照品	人源膀胱癌细胞系总RNA	1管（14μL/管）
6	阴性对照品	正常细胞总RNA	1管（14μL/管）
7	稀释液	无核酸酶水	1瓶（1.5mL/瓶）

注意：

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。

不同批号试剂盒中各组分不可相互混用。

探针引物预混条采用8联PCR管设计，每一个8联PCR管可检测1份样本，8联PCR管上标记数字1-8（8联PCR管示意图请见图2）。8联PCR管1-8号管内装有相应的尿路上皮癌基因检测试剂（Gene1~Gene8）和内参基因（GAPDH）检测试剂（IC），尿路上皮癌相关基因探针由FAM标记，内参基因检测试剂的探针由VIC标记。

编号	检测试剂	荧光信号
1	Gene 1, IC	FAM, VIC
2	Gene 2, IC	FAM, VIC
3	Gene 3, IC	FAM, VIC
4	Gene 4, IC	FAM, VIC
5	Gene 5, IC	FAM, VIC
6	Gene 6, IC	FAM, VIC
7	Gene 7, IC	FAM, VIC
8	Gene 8, IC	FAM, VIC

图2 8联PCR管示意图

2. 试剂盒不包含但检测必需的试剂：

1）样本保存液：杭州可帮基因科技有限公司的样本保存液（浙杭械备 20201184 号）。

2）核酸提取或纯化试剂：杭州可帮基因科技有限公司的尿液脱落细胞 RNA 提取试剂盒（吸附柱法）（浙杭械备 20190193 号）。

3）分析软件：杭州可帮基因科技有限公司的尿路上皮癌基因分析软件，医疗器械注册证书编号： 发布版本号：1.0

3. 完成本检测所需的其他仪器和耗材：

无核酸酶的移液器吸嘴、无核酸酶的离心管/PCR管、PCR仪或恒温金属浴（用于逆转录）、微量紫外分光光度计、掌上离心机（带适用于8联PCR管的转子）、移液器、联网且已安装《尿路上皮癌基因分析软件》的电脑。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒有效期：在-15℃~-25℃保存，有效期为 12 个月。
2. 试剂盒生产日期、失效日期详见标签。
3. 试剂盒开封使用后放置-15℃~-25℃保存，冻融次数不超过 5 次。
4. 运输条件：本试剂盒可在-15℃~-25℃温度下运输；也可在泡沫箱加冰袋的条件下运输，开箱时温度应不超过 8℃，运输时间不超过 84 小时。

【适用仪器】

本试剂盒适用于西安天隆科技有限公司的全自动医用 PCR 分析系统（Gentier 96E）。

【样本要求】

1. 推荐样本类型：随机晨尿，体积 50mL-100mL。
2. 样本收集和保存：直接采用杭州可帮基因科技有限公司的样本保存液（浙杭械备 20201184 号）进行尿液收集和保存。样本保存液被预置分装在材质为聚烯烃塑料的收集管中，规格为 4mL/瓶。使用装有样本保存液的收集管直接采集尿液 50mL-100mL。
新鲜采集的尿液样本在样本保存液中 2℃~8℃保存不超过 3 天，建议于 24 小时内进行 RNA 提取；可将尿液样本以 3000rpm 离心 10min，制备成尿沉渣，置于-15℃及以下保存，保存时间不超过 10 天。
3. 使用杭州可帮基因科技有限公司的尿液脱落细胞RNA提取试剂盒（吸附柱法）（浙杭械备 20190193号）分离纯化RNA。提取的RNA建议立即进行检测，否则请放置-70℃~-80℃保存，保存时间不超过6个月。

【检验方法】

1. 样本 RNA 的提取及浓度、纯度测定

1.1 RNA 提取：取 50mL 尿液参照尿液脱落细胞 RNA 提取试剂盒（吸附柱法）说明书进行 RNA 提取。推荐 RNA 洗脱体积为 30-80μL，得到核酸 RNA。

1.2 RNA 浓度和纯度测定：对步骤 1.1 中提取的 RNA 进行浓度和纯度测定，如下：

- 1) 打开微量紫外分光光度计，选择“核酸模式”，选择检测的样本类型“RNA”；
- 2) 取尿液脱落细胞 RNA 提取试剂盒（吸附柱法）中的 RNA 洗脱液 1μL，选择“背景扣除/空白对照”；
- 3) 取1μL RNA溶液，测定其浓度和纯度。RNA浓度应 $\geq 6.5\text{ng}/\mu\text{L}$ 且RNA吸收光谱曲线无双峰。

注意：1) 微量紫外分光光度计，其RNA吸收光谱的扫描波长范围应涵盖220nm-300nm；

2) 可根据计算公式计算RNA 浓度或微量紫外分光光度计直接给出浓度值：

RNA浓度（ $\text{ng}/\mu\text{L}$ ）= $A_{260} \times 40$ ，“ A_{260} ”为样品在260nm对应吸收值。

2. 逆转录反应

2.1 在室温（ $10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ）下解冻逆转录预混试剂，振荡混匀， $\geq 5000\text{rpm}$ 瞬时离心10秒。依据所需检测样本数量按下表比例计算，并在无核酸酶的离心管/PCR管中配制逆转录反应液。每个待测样本RNA上样浓度应 $\geq 6.5\text{ng}/\mu\text{L}$ ；每次检测应同时设置阴性对照品、阳性对照品和无模板对照（无核酸酶水），对照品的操作同待测样本。

表2 逆转录反应体系（/管）

组成成分	体积（ μL ）/管
逆转录预混试剂	4
逆转录酶预混液	2
待测样本RNA	14

2.2 将所有反应管充分混匀， $\geq 5000\text{rpm}$ 瞬时离心10秒，放入PCR仪或恒温金属浴中进行逆转录反应，反应条件如下：

表3 逆转录反应程序

	步骤1	步骤2	步骤3	步骤4
温度	25°C	50°C	85°C	$2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$
时间	10分钟	120分钟	5分钟	∞

2.3 逆转录反应完成后，反应产物cDNA溶液可用于后续PCR扩增，若不能立即进行扩增，可将cDNA溶液存放在 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ ，保存时间不宜超过24小时；或者 $-15^{\circ}\text{C} \sim -25^{\circ}\text{C}$ 保存，保存时间不超过12个月，冻融次数不超过3次。

3. PCR 扩增

3.1 取离心管或PCR管，在管中加入：90μL PCR扩增预混液、20μL待测样本的cDNA和34μL稀释液，混匀离心备用。

注意：该配制量为1测试使用量，反应组分已经包含了富余量。

3.2 将探针引物预混条解冻，≥5000rpm转速离心1分钟，使得每个反应孔内的探针引物离心至管底，然后轻轻揭开探针引物预混条的条盖。

注意：请勿用力拉扯探针引物预混条的条盖，以防止各孔探针引物预混液进溅或扯断条盖。

3.3 使用移液器吸取步骤3.1中的混合液16μL，分别加入至探针引物预混条每个管内，然后小心盖上探针引物预混条的条盖，≥5000rpm转速离心30秒。

注意：探针引物预混条条盖的方向性。

3.4 在完成第一个样本的加样后，按照步骤3.1 - 3.3，完成剩余样本的配制和加样。

4. PCR 反应管加载

4.1 将探针引物预混条放入荧光PCR仪；其中1号管朝上放置。对应PCR反应布局见表4。

表 4 PCR 反应布局

	1	2	3	...	10	11	12
1	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
2	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
3	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
4	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
5	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
6	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
7	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12
8	样本1	样本2	样本3	...	样本10	样本11	样本12

4.2 选择“运行设置”，选择20μL反应体系，创建循环参数并保存：

第一阶段：95℃ 10分钟，1个循环；

第二阶段：95℃ 15秒，60℃ 1分钟，40个循环。

信号收集：第二阶段60℃时收集荧光信号。

4.3 选择“样本设置”，样本类型设定为“待测”。选择荧光信号“FAM”和“VIC”，选择参比荧光“ROX”。

5. 质量控制

本试剂盒内包含阳性对照品和阴性对照品作为质控，应在每批次检测中添加，通过质控情况反应检测结果的有效性。

5.1 无模板对照（NTC）分析：

NTC管的FAM通道Ct值都应 ≥ 38 或无扩增曲线，否则本次实验结果无效，建议排除污染后重新做一次。若NTC管的VIC信号偶有升起，不影响检测结果的判断，可继续进行分析。

5.2 阳性对照品分析：

阳性对照品的各靶基因Ct值需满足表5所列要求，且内参基因的Ct值均应 ≤ 30 ；将检测结果采用《尿路上皮癌基因分析软件》进行分析，综合评分应 ≥ 85 ，判读结果为尿路上皮癌阳性。

表5 阳性对照品靶基因要求

指标	Ct 要求
Gene 1	≤ 30
Gene 2	≤ 36
Gene 3	≤ 27
Gene 4	≤ 31
Gene 5	≤ 33
Gene 6	≤ 36
Gene 7	≤ 36
Gene 8	≤ 38

5.3 阴性对照品分析：

阴性对照品的内参基因的Ct值均应 ≤ 30 ；将检测结果采用《尿路上皮癌基因分析软件》进行分析，综合评分应 ≤ 50 ，判读结果为尿路上皮癌阴性。

以上要求需在同一批次检测中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

5.4 待测样本的内参基因的Ct值应 ≤ 30 ，如果不符合，说明该样本RNA可能存在部分片段化或降解，试验结果不可信，建议重新提取RNA后再进行实验。

5.5 待测样本应至少有1个靶基因Ct值（FAM） ≤ 38 ，如果不符合，说明该样本RNA未能提供可用于分析的数据，该样本不能用于后续分析。

6. 数据上传和软件分析

6.1 通过全自动医用PCR分析系统（Gentier 96E）软件导出待测样本Ct值结果数据文件；

6.2 打开《尿路上皮癌基因分析软件》（软件版本：1.0）客户端，上传PCR数据文件；

6.3 《尿路上皮癌基因分析软件》自动分析PCR数据，获得分析结果（见图3 尿路上皮癌基因检测结果图）。

【阳性判断值】

本产品根据各基因检测结果Ct值，使用《尿路上皮癌基因分析软件》计算分析获得样本的综合评分，综合评分的阳性判断值为50。

本产品共采用312例临床尿液样本（尿路上皮癌阳性样本120例，阴性样本192例），基于ROC曲线下面积—约登指数法，进行阳性判断值的确定与验证研究。阳性样本包括膀胱尿路上皮癌、肾盂尿路上皮癌、输尿管尿路上皮癌；阴性样本包括泌尿系统良性病变、泌尿系统其他肿瘤等。

【检验结果的解释】

1. 本产品可同时检测样本中8个尿路上皮癌相关基因的表达Ct值。
2. 采用《尿路上皮癌基因分析软件》将样本中8个尿路上皮癌相关基因的表达Ct值进行分析，计算综合评分。

综合评分 ≥ 50 ，判定为尿路上皮癌阳性；综合评分 < 50 ，判定为尿路上皮癌阴性。如图3所示，该样本的综合评分为93，故该样本被判定为尿路上皮癌阳性。

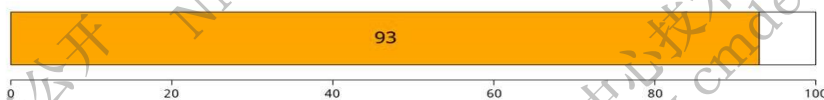


图3 尿路上皮癌基因检测结果图

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的诊断应结合其症状/体征、病史、内镜检查、影像学检查及其他实验室检查等情况综合考虑。
2. 不合理的样本采集、转运及处理，以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
3. 该检测仅限于规定的样本类型及检测仪器和系统，包括适用机型、核酸提取或纯化试剂、检测方法、尿路上皮癌基因分析软件等。

【产品性能指标】

1. 产品性能指标

- 1) 试剂盒应组分齐全, 包装外观清洁、无泄漏、无破损; 标识、标签字迹清楚。试剂融化后, 应澄清, 无浑浊。
- 2) 阳性符合率: 检测 8 份企业阳性参考品, 检测结果均为阳性, 阳性符合率为 100%。
- 3) 阴性符合率: 检测 5 份企业阴性参考品, 检测结果均为阴性, 阴性符合率为 100%。
- 4) 最低检测限: 检测 1 份浓度不高于 6.5ng/μL 的产品最低检测限参考品, 检测结果应为阳性; 检测 1 份浓度不高于 40 拷贝/μL (cDNA) 的基因表达最低检测限参考品, 重复检测 3 次, 每个靶基因的 Ct 值均应 <38。
- 5) 精度密: 通过检测产品重复性参考品、基因表达重复性参考品和临床样本对本试剂盒的重复性、中间精密度和再现性进行研究:
 - ① 检测 2 份产品重复性参考品, 各重复检测 10 次, 检测结果一致, 均为阳性。
 - ② 检测 2 份基因表达重复性参考品, 各重复检测 10 次, 每个靶基因的 Ct 值的变异系数 (CV) 均不高于 5%。
 - ③ 检测临床样本, 评价本试剂盒不同重复、批次、时间、仪器、操作者和地点间的精密度, 结果显示检测结果符合率均为 100%, 每个靶基因的 Ct 值的变异系数均符合 CV≤5%, 综合评分的变异系数均符合 CV≤15%。
- 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; 检测相关靶基因的同源序列, 均未发生交叉反应。检测以下: 血液 (2%v/v)、葡萄糖 (55mmol/L)、蛋白质 (4g/L), 左氧氟沙星 (200mg/dL)、布洛芬 (10mg/dL), 维生素 C (0.8mmol/L), 白色念珠菌 (1×10^9 CFU/mL)、大肠杆菌 (1×10^9 CFU/mL)、金黄色葡萄球菌 (1×10^9 CFU/mL)、淋球菌 (1×10^7 CFU/mL)、解脲脲原体 (5×10^6 CFU/mL), 丝裂霉素 (200mg/L)、吡柔比星 (170mg/L)、吉西他滨 (6700mg/L)、卡介苗 (400mg/L), 乙醇 (1%v/v)、氯化钠 (7.3mg/mL)、血红蛋白 (100mg/mL), 18 种干扰物质在上述特定浓度以下不会对本试剂盒检测结果产生干扰影响。

2. 临床试验

在 3 家临床试验机构完成临床试验。临床研究共纳入统计样本 955 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 95.86%, 临床特异度为 94.49%, 总符合率为 94.97%。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读此说明书，并安装《尿路上皮癌基因分析软件》客户端。
2. 本试剂盒结果会受到样本本身的来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到RNA提取质量、实时荧光PCR仪型号、操作环境及当前分子生物学技术的局限性等限制，可能导致假阳性或假阴性的检测结果。使用者需了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性的局限性。
3. 检测所用的RNA提取后应进行质控，确定质量，并应尽快进行试验，如不能马上进行试验，所提取RNA需保存在-70℃~-80℃，储存时间不超过6个月。
4. 本试剂盒所有试剂均经过特别配制，以用于上述检测。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。避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂。
5. 本试剂盒需低温运输，收到试剂盒后需尽快将试剂于-15℃~-25℃保存。在运输过程会有基因检测试剂附着在探针引物预混条条盖或者壁上，因此使用前请离心，以保证PCR反应体系的体积，防止潜在的污染。
6. 实验过程中需全程带手套和口罩进行操作，样本处理所用的离心管及实验过程中使用的吸头应确保没有核酸酶污染，实验完后用10%次氯酸钠或75%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。
7. 所有化学药品都具有潜在的危险性。具有PCR实验室上岗证的人员才能使用本试剂盒。在首次使用本试剂盒前，公司技术支持人员对操作者进行培训。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套等防护性措施。产品在正确使用过程中不慎溅入眼内应立即用冲眼器或大量清水冲洗眼睛。
8. 所有检测样本和试剂盒中的对照品应视为具有传染性物质，操作和废弃物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》。
9. 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号或现行有效版本）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。

【标识的解释】

无

【参考文献】

1. Chen W, Zheng R, Baade P D, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: A Cancer Journal for Clinicians, 2016, 66(2):115-132.
2. 中国临床肿瘤学会（CSCO）尿路上皮癌诊疗指南 2023。
3. 上尿路尿路上皮癌诊断与治疗中国专家共识（2018 年版）。
4. Holyoake A, O'Sullivan P, Pollock R, et al. Development of a multiplex RNA urine test for the detection and stratification of transitional cell carcinoma of the bladder[J]. Clinical Cancer Research An Official Journal of the American Association for Cancer Research, 2008, 14(3):742-749.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：杭州可帮基因科技有限公司

住所：浙江省杭州市临平区余杭经济技术开发区新颜路22号7幢301M

电话： 传真： E-mail:

售后服务单位名称：

电话： 传真： E-mail:

生产地址：杭州市临平区龙船坞路157号3幢5层502室；

杭州市临平区龙船坞路157号5幢3层1309、1310室

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】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】