

受理号：CSZ2400167

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 CDO1/AJAP1/GALR1 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：武汉凯德维斯生物技术有限公司

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	16

## 基本信息

### 一、申请人名称

武汉凯德维斯生物技术有限公司

### 二、申请人住所

湖北省武汉市东湖新技术开发区九龙南路 19 号妇科肿瘤诊疗创新产品研发中心和配套生产基地一期 1-5 层

### 三、生产地址

武汉市东湖新技术开发区高新二路 388 号，武汉光谷国际生物医药园企业加速器 3.1 期第 15 棟 1 层（1）厂房、2 层（1）厂房

# 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：

序号	组分名称	主要组成成分	12 测试/盒	24 测试/盒	48 测试/盒	96 测试/盒
1	ECM 反应液 I	dNTPs、PCR buffer、Taq DNA 聚合酶、超纯水	160 $\mu$ L×1 管	320 $\mu$ L×1 管	650 $\mu$ L×1 管	1300 $\mu$ L×1 管
2	ECM 反应液 II	CDO1、GALR1、AJAP1、B2M 引物探针混合液	85 $\mu$ L×1 管	170 $\mu$ L×1 管	350 $\mu$ L×1 管	700 $\mu$ L×1 管
3	ECM 阳性对照	CDO1、GALR1、AJAP1、B2M 混合质粒 DNA	10 $\mu$ L×1 管	20 $\mu$ L×1 管	30 $\mu$ L×1 管	60 $\mu$ L×1 管
4	ECM 空白对照	TE 缓冲液	30 $\mu$ L×1 管	30 $\mu$ L×1 管	60 $\mu$ L×1 管	60 $\mu$ L×1 管

### （二）产品预期用途

本产品适用于体外定性检测子宫腔脱落细胞样本 DNA 中 CDO1、AJAP1、GALR1 基因的甲基化状态。

临幊上与超声等其他诊断方法联合用于疑似子官内膜癌患者的辅助诊断。检测结果阳性不能作为肿瘤早期诊断或者确诊的依据，检测结果阴性也不能排除子官内膜癌的可能。临幊医生应该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。该检测不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

### （三）产品包装规格

12 测试/盒；24 测试/盒；48 测试/盒；96 测试/盒。

### （四）产品检验原理

本试剂盒采用了甲基化特异 FCR 扩增引物 (MSP) 结合甲基化特异性 Taqman/MGB 探针的多重实时荧光 PCR 方法，实现对宫腔脱落细胞样本中 CDO1、AJAP1 和 GALR1 基因甲基化的同步检测。从人宫腔脱落细胞样本中获得基因组 DNA，然后用重亚硫酸盐进行转化，并通过四重荧光 FCR 扩增来测定亚硫酸盐转化后的 DNA ( bisDNA )。

设计的四重反应体系中，CY5、ROX 和 FAM 通道作为检测信号，分别对甲基化的 CDO1、AJAP1 和 GALR1 基因 DNA 片段的检测；VIC 通道作为内标信号，对管家基因 B2M 的保守序列进行检测，用于评估待检样本的 DNA 含量和质量。

检测样本时，应同时检测空白对照和阳性对照，对试剂盒的性能、仪器性能、样本质量、实验环境及操作进行监测，确保样本检测结果准确可靠。

## 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引物、探针、Taq DNA 聚合酶和 dNTP Mix。这些原料均是通过外购的方式获得。

其中引物、探针的序列均由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰、纯化方式获得；Taq DNA 聚合酶由供应商克隆表达后获得，dNTP Mix 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阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和精密度参考品，组成如下：

阳性参考品包括 9 种，分别命名为 P1~P9,其中阳性参考品 P1~P3 为一定 DNA 浓度下由人全甲基化与人非甲基化全基因组 DNA 制备的不同甲基化比例的混合样本；阳性参考品 P4~P5 为高甲基化比例的细胞基因组 DNA；阳性参考品 P6~P7 为不同甲基化比例的人子宫内膜癌宫腔脱落细胞基因组 DNA；阳性参考品 P8~P9 为人子宫内膜癌宫腔脱落细胞。

阴性参考品包括 8 种，分别命名为 N1~N8,其中阴性参考品 N1~N4 为一定 DNA 浓度下人非子宫内膜癌宫腔脱落细胞基因组 DNA；阴性参考品 N5~N6 分别为一定 DNA 浓度下

TBX5 甲基化阳性和 HS3ST2 甲基化阳性人非子宫内膜癌宫腔脱落细胞基因组 DNA；阴性参考品 N7~N8 为人非子宫内膜癌宫腔脱落细胞。

检测限参考品包括 1 种，命名为 B1，为一定 DNA 浓度下由人全甲基化与人非甲基化全基因组 DNA 制备的低甲基化比例的混合样本。

精密度参考品包括 3 种，分别命名为 R1~R3，其中 R1 和 R2 为一定 DNA 浓度下由人全甲基化与人非甲基化全基因组 DNA 制备不同甲基化比例的混合样本，R3 为一定 DNA 浓度下低于最低检测限的非子宫内膜癌患者宫腔脱落细胞样本。

本试剂盒同时还设置阳性对照和空白对照，对试剂盒的性能、仪器性能、样本质量、实验环境及操作进行监测，确保样本检测结果准确可靠。此外，每个样本均检测内标基因 B2M，用于评估待检样本的 DNA 含量和质量。

## （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 Taq 酶、dNTP 混合液（dNTP Mix）、缓冲液（buffer）、引物、探针等组分的用量进行优化，获得最佳的反应体系组合；通过对反应液用量、退火温度、退火时间的优化，确保都能够稳定检出，确定最终的反应体系组分、用量及反应条件。

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（阳性参考品符合率、阴性参考品符合率）、精密度、检测限、分析特异性（干扰试验、交叉反应）的性能评估和配套试剂性能研究（核酸提取试剂及甲基化检测样本前处理试剂盒）。

准确度研究中，申请人在三种适用机型上，分别使用三批次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，检测结果与临床参考标准（病理学）结果进行比对，得出子宫内膜癌检测灵敏度为 94%，特异度为 96.67%；子宫内膜不典型增生（AEH）检测灵敏度为 47.22%。

精密度研究中，申请人通过不同地点、机型、人员、轮次、日间和批次对中阳性、弱阳性以及阴性样本进行连续 20 天的检测，本试剂盒检测结果的  $C_t$  值变异系数（重复性、中间精密度和再现性 CV）均不大于 5.0%。

检测限研究中，申请人在一种适用机型上，进行了检测限的建立，然后在三种适用机型上，进行了检测限的验证。结果

表明,试剂盒的检测限为19ng/ $\mu$ L BisDNA 浓度下甲基化比例为2.5%。

分析特异性研究,包括干扰试验和交叉反应。

交叉反应的研究结果表明,试剂盒对其他人子宫内膜癌甲基化阳性基因 HS3ST2 和 TBX5 的样本、宫腔脱落细胞样本转化前 DNA 样本、巨细胞病毒、HSV-1 单纯疱疹病毒、解脲支原体、人型支原体、大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、人乳头瘤病毒 HPV16 型、18 型、33 型、52 型、58 型别病毒均无交叉反应。

本试剂盒对妇科其他癌症或肿瘤样本(如宫颈癌、卵巢癌、子宫肉瘤)总体特异性大于 70%。对扩增产物的 SNP 分析研究显示,人群中的 SNP 位点对检测结果无影响。

干扰研究的结果表明,样本中含有以下浓度的内源及外源干扰物:200g/L 血红蛋白、50g/L 白蛋白、1000mg/L 黏液及糖原(粘蛋白)、300ng/mL 雌激素( $\beta$ -雌二醇)、20ng/mL 孕激素(黄体酮)、50mIU/L 人绒毛膜促性腺激素、3ug/L 粒细胞集落刺激因子、30ug/L 生长激素、2ug/mL 地塞米松、3ug/mL 环孢素、30%(v/v)甲醇、20mg/mL 替硝唑阴道片、174mg/mL 保妇康栓、10%(v/v)玻尿酸、10mg/mL 妻之友(壬苯醇醚栓)和 10%(v/v)洁尔阴洗液,对试剂盒检测结果均无影响。

对与试剂盒配合使用的核酸提取试剂进行了提取效率、提

提取纯度和产量、提取重复性、抗干扰能力性能及选择研究, 对与试剂盒配合使用的甲基化检测样本前处理试剂盒进行了回收率、内控稳定性、转化效率、检测限、精密度研究, 及不同核酸提取试剂、甲基化检测样本前处理试剂盒不同搭配性能研究, 结果表明配套的核酸提取试剂和甲基化检测样本前处理试剂盒均符合检测要求, 但需按照说明书配套组合要求适用。

#### （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腔脱落细胞样本, 包括阳性判断值的初步确定和验证两部分研究。选择 1168 例临床样本作为训练集, 以病理检查结果作为临床参考标准, 采用逻辑回归方法对 3 个基因  $\Delta Ct$  值进行联合建模, 确定了逻辑回归方程。然后选择不同预测概率值 (P 值) 作为 Cut Off, 结合受试者工作特征 (ROC) 曲线, 确定最佳 Cut Off 值。

然后通过 529 例临床样本作为验证集, 确定最佳的 Cut Off 值为 0.46。当 P 值  $>0.46$  时, 结果判为阳性; 当 P 值  $\leq 0.46$  时, 结果判为阴性。

同时通过内控系统有效性的初步定值研究和最终确定研究, 确定内控 VIC 通道  $Ct$  值  $<31$  为样本检测有效性质量控制标准。

#### （五）稳定性研究

申请人对该产品的稳定性研究包括实时-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（包括宫腔脱落细胞样本、宫腔脱落细胞提取 DNA 及宫腔脱落细胞提取转化后 DNA 的稳定性）。

实时-运输稳定性试验：3 批试剂盒采用泡沫箱加干冰运输 7 天，运回后立即置于  $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$  储存条件储存。考察试剂盒运输前、运输后以及放置 3、6、9、12 和 14 个月共 7 个时间点的各项指标，结果显示试剂盒在生产运输后保存至 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，申请人对产品的使用稳定性、运输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

申请人在华中科技大学同济医学院附属同济医院、浙江大学医学院附属妇产科医院、郑州大学第三附属医院、福建省妇幼保健院和深圳市妇幼保健院共五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子宫内膜癌临床参考标准进行比较研究，对产品临床性能进行评价。入组病例为有子宫内膜癌相关症状/体征、临床需进一步检查的疑似子宫内膜癌患者，以及经影像学等非侵入性方法无法决策是否进行宫腔镜检查的

病例。样本类型为宫腔脱落细胞样本。临床试验共入选受试者 1482 例，其中临床参考方法确诊子宫内膜癌病例 388 例，不典型增生 69 例，其他子宫良性病变等干扰病例 1025 例。临床确诊为子宫内膜癌的病例中包括 I 期 262 例，II 期 54 例，III 期 26 例，IV 期 6 例；入选病例包括 I 型子宫内膜癌病例 264 例，II 型子宫内膜癌病例 70 例；包括不同组织分型的病例，其中子宫内膜样癌 353 例，其他病理类型 30 例。干扰病例包括子宫良性疾病以及其他生殖道良性疾病 938 例，其他生殖道肿瘤（宫颈癌和卵巢癌等）87 例等。试验结果显示，本产品与临床参考标准相比，临床灵敏度为 92.27%（95%CI: 89.18%，94.53%），临床特异度为 91.90%（95%CI: 90.07%，93.42%）。针对不典型增生病例，灵敏度为 56.52%。

此外，临床试验还纳入 250 例疑似子宫内膜癌病例，采用试验体外诊断试剂与 NGS 方法进行比较研究，确认本产品的临床检测性能。试验结果显示：针对 CDC1 基因，阳性病例共 133 例，阳性符合率为 97.74%（95%CI: 93.58%，99.23%），阴性符合率为 99.15%（95%CI: 95.32%，99.85%）；针对 AJAP1 基因，阳性病例共 127 例，阳性符合率为 98.43%（95%CI: 94.44%，99.57%），阴性符合率为 95.93%（95%CI: 90.84%，98.25%）；针对 GALR1 基因，阳性病例共 100 例，阳性符合率为 97.00%。

(95%CI: 91.55%, 98.97%), 阴性符合率为 96.00% (95%CI: 91.55%, 98.15%)。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, 该产品临床试验符合技术审评要求。

## 四、产品受益风险判定

### (一) 受益评估

本产品适用于体外定性检测人宫腔脱落细胞样本 DNA 中 CDO1、AJAP1、GALR1 基因的甲基化状态。临幊上与超声等其他诊断方法联合用于疑似子官内膜癌患者的辅助诊断。检测结果阳性不能作为肿瘤早期诊断或者确诊的依据, 检测结果阴性也不能排除子官内膜癌的可能。临幊医生应该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。该检测不宜用于普通人群的肿瘤筛查。其临幊应用的主要受益在于: 该产品可以为子官内膜癌患者的辅助诊断提供多一种无创性检测方法。依据现有的临床试验结果, 其子官内膜癌的灵敏度为 92.27%, 特异度为 91.90%, 对子官内膜不典型增生的灵敏度为 56.52%。

### (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, 该产品存在假阳性和假阴性

的可能,说明书中已明确检测结果阳性不作为子宫内膜癌临床确诊的唯一依据,检测结果阴性也不能排除子宫内膜癌的可能,临幊上应结合病例超声等其他诊断及检测方法进一步确认病例状态。

2.与生产有关的安全风险,例如原材料未经过工艺验证。  
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、运输试剂盒。

4.与使用有关的风险,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要求按医疗废弃物统一销毁处理。

通过对人 CDO1/AJAP1/GALR1 基因甲基化检测试剂盒(荧光 PCR 法)从生产原材料、配制、检测、标识、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,通过产品技术要求和使用说明书及企业管理制度对产品质量的全过程进行控制和采取风险防范措施,已将产品的安全风险系数降到了接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,但为保证用械安

金，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：

本产品适用于体外定性检测人宫腔脱落细胞样本 DNA 中 CDO1、AJAP1、GALR1 基因的甲基化状态。

临幊上与超声等其他诊断方法联合用于疑似子宮内膜癌患者的辅助诊断。检测结果阳性不能作为肿瘤早期诊断或者确诊的依据，检测结果阴性也不能排除子宮内膜癌的可能。临幊医生应该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。该检测不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

2. 警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检验方法的局限性及使用中的注意事项。

## 综合评价意见

本申报项目属于创新医疗器械（创新审查受理号：CQTS2300213）。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资料进行系统评价，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1月15日

附件：产品说明书

# 人 CDO1/AJAP1/GALR1 基因甲基化检测试剂盒

## （荧光 PCR 法）说明书

### 【产品名称】

通用名称：人 CDO1/AJAP1/GALR1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

### 【包装规格】

12 测试/盒； 24 测试/盒； 48 测试/盒； 96 测试/盒。

### 【预期用途】

本产品适用于体外定性检测人宫腔脱落细胞样本 DNA 中 CDO1、AJAP1、GALR1 基因的甲基化状态。

临幊上与超声等其他诊断方法联合用于疑似子宮内膜癌患者的辅助诊断。检测结果阳性不能作为肿瘤早期诊断或者确诊的依据，检测结果阴性也不能排除子宮内膜癌的可能。临幊医生应该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。该检测不宜用于普通人群的肿瘤筛查。

子宮内膜癌（endometrial cancer, EC）是女性生殖道常见的恶性肿瘤，多发生于绝经后的老年女性，中位发病年龄 63 岁。近年来，由于高脂高热饮食和低运动量生活方式的影响，子宮内膜癌在我国的发病率呈年轻化和逐年上升趋势。约有 70% 的子宮内膜癌诊断时肿瘤局限于子宮体，属临幊早期，预后较好。部分患者可能因忽略早期不规则阴道流血和阴道排液等症状而失去早期诊断和治疗的机会。DNA 甲基化是肿瘤发生的早期分子事件，近几年来，越来越多的甲基化基因被确定为子宮内膜癌的生物标志物。

半胱氨酸双加氧酶 1(cysteine dioxygenase, CDO1)被认为是关键的抑癌基因，参与催化有毒性的半胱氨酸生物降解为半胱氨酸亚磺酸，从而调节体内半胱氨酸的浓度，可帮助降低细胞中的活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平。贴壁连接相关蛋白 1 (AJAP1) 是一种典型的贴壁连接分子，已在许多癌症类型中发现是肿瘤抑制因子。AJAP1 失活可以介导  $\beta$ -连环蛋白在细胞质中积累，然后将其转移到细胞核，激活  $\beta$ -连环蛋白转录活性和下游基因，从而可能对细胞周期和细胞凋亡产生影响。Galanin 是一种神经肽，属于肽家族，其表达与许多癌症有关。它通过三种不同的受体亚型 (GALR1、GALR2 和 GALR3) 调节许多生物学和病理功能。GALR1 表达缺

失与其启动子高甲基化有关，支持 GALR1 作为肿瘤抑制基因的假设。

### 【检验原理】

本试剂盒采用了甲基化特异 PCR 扩增引物 (MSP) 结合甲基化特异性 Taqman/MGB 探针的多重实时荧光 PCR 方法，实现对宫腔脱落细胞样本中 CDO1、AJAP1 和 GALR1 基因甲基化的同步检测。从人宫腔脱落细胞样本中获得基因组 DNA，然后用重亚硫酸盐进行转化，并通过四重荧光 PCR 扩增来测定亚硫酸盐转化后的 DNA (LsDNA)。

设计的四重反应体系中，CY5、ROX 和 FAM 通道作为检测信号，分别对甲基化的 CDO1、AJAP1 和 GALR1 基因 DNA 片段的检测；VIC 通道作为内标信号，对管家基因 B2M 的保守序列进行检测，用于评估待检样本的 DNA 含量和质量。

检测样本时，应同时检测空白对照和阳性对照，对试剂盒的性能、仪器性能、样本质量、实验环境及操作进行监测，确保样本检测结果准确可靠。

### 【主要组成成分】

#### 1. 试剂盒组成

本试剂盒由反应液 I、反应液 II、阳性对照以及空白对照组成，试剂盒组成成分见表 1。

表 1 试剂盒组成

序号	组分名称	主要组成成分	12 测试/盒	24 测试/盒	48 测试/盒	96 测试/盒
1	ECM 反应液 I	dNTPs、PCR buffer、Taq DNA 聚合酶、超纯水	160 $\mu$ L×1 管	320 $\mu$ L×1 管	650 $\mu$ L×1 管	1300 $\mu$ L×1 管
2	ECM 反应液 II	CDO1、GALR1、AJAP1、B2M 产物探针混合液	85 $\mu$ L×1 管	170 $\mu$ L×1 管	350 $\mu$ L×1 管	700 $\mu$ L×1 管
3	ECM 阳性对照	CDO1、GALR1、AJAP1、B2M 混合质粒 DNA	10 $\mu$ L×1 管	20 $\mu$ L×1 管	30 $\mu$ L×1 管	60 $\mu$ L×1 管
4	ECM 空白对照	TE 缓冲液	30 $\mu$ L×1 管	30 $\mu$ L×1 管	60 $\mu$ L×1 管	60 $\mu$ L×1 管

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

#### 2. 自备试剂和耗材

(1) 细胞保存液：细胞保存液 PreservCyt Solution (Hologic, Inc. 国械备 20140197)。

(2) 采样拭子：一次性使用无菌子宫内膜取样器 (武汉凯德维斯生物技术有限公司，鄂械

注准 20232184243)。

(3) 配套核酸提取试剂和甲基化检测样本前处理试剂盒固定搭配使用要求如下：

。表 2 核酸提取和亚硫酸盐转化的试剂组合

序号	组合	提取试剂	亚硫酸盐转化试剂
1	手工柱法 1	核酸提取试剂 (鄂汉械备 20210447 号)	甲基化检测样本前处理试剂盒 (鄂汉械备 20230055 号)
2	手工柱法 2	核酸提取试剂 (鄂汉械备 20210447 号)	EZ DNA Methylation-Lightning Kit (Zymo Research, 货号: D5031)
3	自动磁珠法	核酸提取试剂盒(磁珠法) (鄂汉械备 20230717 号)	甲基化检测样本前处理试剂盒(磁珠法) (鄂汉械备 20230716 号)

注：请按照配套组合进行核酸提取和转化，不能随意交叉配合使用。

(4) 0.2mL 8 联 PCR 管或 96 孔 PCR 板。

(5) 无 DNase 和 RNase 的过滤吸头、TE 缓冲液。

#### 【储存条件及有效期】

1. 试剂盒避光储存在-20±5℃，有效期为 12 个月。
2. 尽量避免试剂反复冻融，建议冻融次数不超过 8 次。
3. 开封后未使用完毕的试剂继续在-20±5℃保存，有效期为 12 个月。
4. 生产日期和使用期限见标签，请于有效期内使用。  
② 本试剂盒应在泡沫箱加干冰的冷冻条件下运输，运输时间不超过一周，运输过程中温度不超过 0℃。

#### 【适用仪器】

实时荧光定量 PCR 仪：FQD-96A（杭州博日科技股份有限公司，国械注准 20153220273）、  
SLAN-96P（上海宏石医疗科技有限公司，国械注准 20183220659）和 7500（生命科技控股私人  
有限公司，国械注进 20163220767）。

#### 【样本要求】

1. 适用样本类型：宫腔脱落细胞样本。
2. 样本采集：使用一次性使用无菌子宫内膜取样器采集宫腔脱落细胞，取样时需将子宫样品刷完全回撤到外套管中，轻轻穿过宫颈插入，直至器械头端与宫底齐平，回拉外套管，直至抵达手柄为止，旋转子宫样品刷 4~6 次，采样完成后沿子宫样品刷推外套管至刷头，然后取出器械，立即将其转移至细胞保存液中。

3. 样本保存和运输：用细胞保存液保存的样本可在常温（不超过 40℃条件下）下保存和运输，总时间应不超过 3 周。样本 2~8℃储存应不超过 6 个月，-20±5℃储存应不超过 1 年。应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。
4. 核酸提取和保存：本试剂盒未配备核酸提取试剂，需采用推荐的核酸提取试剂进行 DNA 提取，DNA 提取液可置于-20±5℃保存，保存时间不超过一年。应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。
5. DNA 重亚硫酸盐转化：按照推荐的亚硫酸盐转化试剂盒说明书投入一定量的 DNA 提取液用来转化，转化后的 DNA 样本建议立即检测，否则请于-20±5℃保存，保存时间不超过 6 个月。应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。要求 DNA 转化液（BisDNA）浓度 $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ ，如浓度过低，请重新进行 DNA 的提取或转化以提高 BisDNA 浓度。

### 【检验方法】

#### 1. 样本准备

##### （1）核酸提取

使用【主要组成成分】中 2.自备试剂和耗材推荐的宫腔脱落细胞样本 DNA 提取试剂盒，按照其说明书要求进行样本提取即可。其中宫腔脱落细胞样本用量为 200 $\mu\text{L}$ ，当小于 200 $\mu\text{L}$  时需加 PBS 补齐至 200 $\mu\text{L}$ ；洗脱溶剂使用核酸提取试剂盒自带的洗脱液，洗脱体积为 50~100 $\mu\text{L}$ 。

##### （2）核酸转化

使用【主要组成成分】中 2.自备试剂和耗材推荐的亚硫酸盐转化试剂盒按照其说明书要求进行核酸转化。其中 DNA 投入量为 50~2000ng，洗脱溶剂使用亚硫酸盐转化试剂盒自带的洗脱液，洗脱体积为 10~30 $\mu\text{L}$ ，BisDNA 使用时浓度要求 $\geq 10\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

#### 2. 试剂准备

取出冻存的试剂盒，将各组分平衡至室温，待其完全解冻后，振荡混匀 10s，然后瞬时离心，备用。

#### 3. 反应液配制

（1）反应数的计算：反应数（N）=样本数+1 个空白对照+1 个阳性对照=样本数+2。

（2）配制反应液：N $\times$ （11.85 $\mu\text{L}$  反应液 I + 6.15 $\mu\text{L}$  反应液 II） $\times 1.1$

（注意：剩余试剂应及时放回-20±5℃继续保存。）

(3) 反应液的分装：将配制的反应液按照 18 $\mu$ L/孔分装至 8 联 PCR 反应管或者 96 孔 PCR 反应板，分装的反应孔数不少于计算的反应数。

#### 4. 加样

(1) 向 PCR 反应孔中分别加入空白对照 (NC)、待测样本 BisDNA、阳性对照 (PC)，每个模板的加样体积为 2 $\mu$ L。

(2) 加样完毕后盖紧管盖或确保贴紧封膜，瞬时离心，确保管壁上不沾有液滴。

#### 5. 上机检测

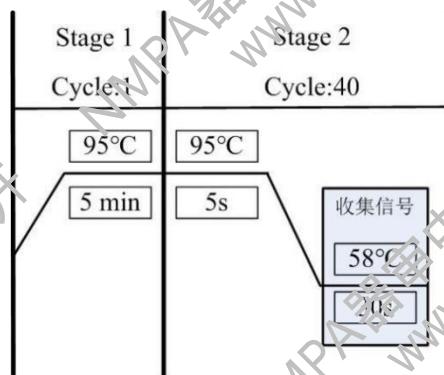
(1) 将 PCR 反应条/板置荧光 PCR 仪中。

(2) 荧光通道设置如下：

表 3 荧光通道设置模式

基因	CDO1	AJAP1	GALR1	B2M
报告荧光	CY5	ROX	FAM	VIC

(3) PCR 反应条件设置如下：



(4) 确认软件设置无误后，保存文件并运行。

#### 6. 结果分析

(1) 基线设置：通常使用自动基线，如个别反应孔出现基线不平的现象，则应手动调平。也可手动设置基线，基线起点应设在背景信号开始维持平稳的地方，终点要避免覆盖信号已经开始有明显增长的地方，使基线呈现为水平直线。

(2) 阈值设置：手动设置阈值线。用户可根据实际情况在扩增曲线的指数期范围内灵活设

置阈值，使各项参数符合质量控制的要求。

## 7. 质量控制

(1) 空白对照：CY5、ROX、FAM 和 VIC 信号应无扩增曲线或 Ct 值>35。

(2) 阳性对照：CY5、ROX、FAM 和 VIC 信号应均有明显指数增长期，且 Ct 值≤32。计算阳性对照 P 值，检测结果应为阳性。

(3) 待测样本：VIC 信号 Ct 值≤31。

以上要求在同一试验中同时满足，否则本次试验无效。

## 【阳性判断值】

### 1. 计算各目标基因与内标基因之间的△Ct值

$$CDQ1 \text{ 与内标: } \Delta Ct_{CDQ1} = Ct_{CY5} - Ct_{VIC}$$

$$AJAP1 \text{ 与内标: } \Delta Ct_{AJAP1} = Ct_{ROX} - Ct_{VIC}$$

$$GALR1 \text{ 与内标: } \Delta Ct_{GALR1} = Ct_{FAM} - Ct_{VIC}$$

注： (1)  $Ct_{CY5}$ 、 $Ct_{ROX}$ 、 $Ct_{FAM}$  和  $Ct_{VIC}$  分别表示反应孔中 CY5、ROX、FAM 和 VIC 信号的 Ct 值。

(2) 当 CY5、ROX 或 FAM 信号无扩增曲线时，Ct 值按照最大循环数 40 来计算。

### 2. 计算P值

使用 P 值计算公式分析 3 个目标基因的△Ct 值，获得样本综合风险值（P 值），样本 P 值在 0~1 之间。

### 3. 检测结果判定

当 P 值>0.46 时，结果为阳性；当 P 值≤0.46 时，结果为阴性。

## 【检验结果的解释】

1. 若空白对照任一通道有扩增曲线升起且 Ct 值<35，则表明当前环境可能有污染，此次实验无效，建议重新实验。
2. 若阳性对照任一通道无扩增曲线或 Ct 值>32，则表明试剂性能下降或失效，建议更换试剂或阳性对照重新检测。
3. 若待测样本的内标通道 Ct 值>31，则表明样本有效浓度过低或者 PCR 扩增受到抑制或试剂失效，建议重新检测或重新提取、转化 DNA 后检测或重新采样后检测。

4. 当待测样本的全部信号同时无扩增曲线或 Ct 值  $>35$  时, 表明样本不合格或漏加模板, 建议重新检测或重新采样后检测。

5. 若样本检测结果为阳性, 提示受检者取样时患有子宫内膜癌风险较高, 建议进行宫腔镜和/或组织活检等检查以确诊。

6. 若样本检测结果为阴性, 提示受检者取样时患有子宫内膜癌风险较低, 但并不能完全排除疾病风险, 临床医生应结合患者其他诊断信息对检测结果进行综合判断, 必要时仍建议进行宫腔镜和/或组织活检等检查。

#### 【检验方法的局限性】

1. 本产品的使用者应该是接受过 PCR 操作技能培训的相关专业人员。

2. 本产品检测结果仅供临床参考, 不应单独作为确诊或排除病例的依据。临床医生需结合病例的临床症状及其它实验室检测指标等实际情况进行综合判断, 不能以本试剂盒检测结果作为临床诊断的唯一依据。

3. 检测结果会受到模板 DNA 质量的影响。DNA 质量可能受样本来源、采集过程、运输条件、样本处理等因素影响, 同时也受 DNA 提取、亚硫酸盐转化方法、操作环境、以及当前分子生物学技术的局限性等的限制, 可能出现假阳性或假阴性的检测结果。使用者须充分了解检测过程中可能存在的潜在风险。

4. 检测结果为阴性时, 不能完全排除子宫内膜癌的可能。采集样本时未刷取到肿瘤细胞或肿瘤细胞过少、样本处理不当造成核酸降解都可能造成假阴性的结果。

#### 【产品性能指标】

1. 外观: 外观整齐, 组分齐全、液体组分无渗漏。

2. 阳性符合率: 检测9份企业阳性参考品, 结果应均为阳性。

3. 阴性符合率: 检测8份企业阴性参考品, 结果应均为阴性。

4. 精密度: 平行检测2份阳性企业精密度参考品10次, 结果均为阳性, 且 Ct 值的变异系数 (CV) 均不高于 5.0%。平行检测1份阴性企业精密度参考品10次, 结果均为阴性。

5. 检测限: 检测1份企业检测限参考品 (核酸浓度  $10\text{ng}/\mu\text{L}$ , 甲基化比例 1%), 重复检测20次, 阳性检出率  $\geq 95\%$ 。

6. 抗干扰能力: ①对内源性干扰物  $200\text{g}/\text{L}$  血红蛋白、 $50\text{g}/\text{L}$  白蛋白、 $1000\text{mg}/\text{L}$  黏液及糖原 (粘蛋

白)、300ng/mL雌激素(β-雌二醇)、20ng/mL孕激素(黄体酮)进行了干扰实验,检测结果显示这些干扰物对试剂盒检测结果均无影响。②对外源性干扰物50mIU/L人绒毛膜促性腺激素、3ug/L粒细胞集落刺激因子、30ug/L生长激素、2ug/mL地塞米松、3ug/mL环孢素、30%(v/v)甲醇、20mg/mL替硝唑阴道片、174mg/mL保妇康栓、10%(v/v)玻尿酸、10mg/mL婓之友(壬苯醇醚栓)和10%(v/v)洁尔阴洗液进行了干扰实验,检测结果显示这些干扰物对试剂盒检测结果均无影响。

7.临床性能:在5家临床试验机构完成临床试验,共纳入1482例病例,与临床参考标准对比的结果显示:本产品的子宫内膜癌灵敏度为92.03%,特异度为91.90%。针对子宫内膜不典型增生病例,灵敏度为56.52%。针对来源于生殖系统的其他肿瘤,宫颈癌的特异度为77.56%,卵巢癌的特异度为76.32%。本产品针对绝经前人群灵敏度为89.38%,特异度为94.08%,绝经后人群的灵敏度为93.81%,特异度为84.38%,绝经后人群特异度低于绝经前人群。

#### 【注意事项】

1. 实验前请检查试剂盒上的有效期,并严格参照说明书要求进行实验。
2. 避免标记的荧光探针淬灭,试剂盒应避光保存。
3. 避免在不必要的冻融试剂盒中的试剂。
4. 为防止试剂污染,实验时确保实验室没有DNA的污染,推荐在添加DNA模板时,使用单独、专用的移液器和吸头,使用配液的EP管要求从未开盖。
5. 本试剂盒的所有成分经过特别配制,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。
6. 反应后的试剂管如不作其它研究应避免打开,作为医疗废物,应按相应规定妥善处理;
7. 实验完毕用0.5%次氯酸钠或75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器,使用过的试剂盒为临床废弃物,应该妥善处理。
8. 进行实验的场所应满足临床PCR扩增实验室的规范要求。扩增产物的污染和核酸提取中样本间的交叉污染,很容易导致异常结果的出现。因此,PCR临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施,实验操作人员需要经过专门培训。

#### 【标识的解释】

**[IVD]:** 体外诊断。

#### 【参考文献】

[1] Doufekas K, Hadwin R, Kandimalla E, et al. GALR1 methylation in vaginal swabs is highly accurate in identifying women with endometrial cancer[J]. *Int J Gynecol Cancer*, 2013, 23(6): 1050-1055.

[2] Huang RL, Su PH, Liao YP, et al. Integrated Epigenomics Analysis Reveals a DNA Methylation Panel for Endometrial Cancer Detection Using Cervical Scrapings[J]. *Clin Cancer Res*, 2017, 23(1): 263-272.

[3] Lai HC, Wang YC, Yu MH, et al. DNA methylation as a biomarker for the detection of hidden carcinoma in endometrial atypical hyperplasia[J]. *Gynecologic Oncology*, 2014, 135(3): 552-559.

[4] den Helder RV, Wever BM, van Trigtmel JA, et al. DNA methylation markers for endometrial cancer detection in minimally invasive samples: A systematic review. *Epigenomics*, 2020, 12(18): 1661-1672.

[5] Liew PL, Huang RL, Wu TI et al. Combined genetic mutations and DNA-methylated genes as biomarkers for endometrial cancer detection from cervical scrapings[J]. *Clin. Epigenetics*, 2019, 11(1): 170.

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：武汉凯德维斯生物技术有限公司

住所：湖北省武汉市东湖新技术开发区九龙南路19号妇科肿瘤诊疗创新产品研发中心和配套生产基地一期1-5层

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二路388号，武汉光谷国际生物医药园企业加速器3.1期第15幢1层（1）厂房、2层（1）厂房

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】