

受理号：CSZ2100280

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人外泌体 CA125、HE4、C5a 检测试剂盒（化学发光法）

产品管理类别： 第三类

申请人名称： 上海思路迪生物医学科技有限公司

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.....	7
三、 临床评价概述.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	15

## 基本信息

### 一、申请人名称

上海思路迪生物医学科技有限公司

### 二、申请人住所

上海市闵行区新骏环路 158 号 2 号楼 304 室、404 室、402 室、  
401 室

### 三、生产地址

上海市闵行区新骏环路 158 号 2 幢 304 室、404 室、402 室

# 技术审评概述

## 一、产品概述

### (一) 产品主要组成成分

本试剂盒含有提取试剂、CA125 试剂组、HE4 试剂组、C5a 试剂组、校准品、提取质控品、检测质控品。详见表 1。

表 1 产品主要组成成分

组份	名称	主要组成成分	数量
提取试剂	试剂 Ex	高分子聚合物钠盐;	12.0mL×1 瓶
	试剂 Ly	表面活性剂、磷酸钠盐;	75.0mL×1 瓶
CA125 试剂组	125-M	抗 CA125 鼠单抗包被的磁微粒, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶
	125-R1	吡啶盐标记的抗 CA125 鼠单抗, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶
HE4 试剂组	HE4-M	抗 HE4 鼠单抗包被的磁微粒, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶
	HE4-R1	吡啶盐标记的抗 HE4 鼠单抗, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶
C5a 试剂组	C5a-M	链霉亲和素包被的磁微粒, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶
	C5a-R1	吡啶盐标记的抗 C5a 鼠单抗, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶
	C5a-R2	生物素化的抗 C5a 鼠单抗, 牛血清白蛋白缓冲液, 防腐剂;	6.0mL×1 瓶

组份	名称	主要组成成分	数量
校准品	CA125-C1	天然 CA125 抗原 (0.5-5U/mL), 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	0.6mL×1 瓶
	CA125-C2	天然 CA125 抗原 (7-14U/mL), 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	0.6mL×1 瓶
	HE4-C1	重组 HE4 抗原(0.5-5pmol/L), 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	0.6mL×1 瓶
	HE4-C2	重组 HE4 抗原(7-14pmol/L), 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	0.6mL×1 瓶
	C5a-C1	天然 C5a 抗原 (1-6ng/mL), 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	0.6mL×1 瓶
	C5a-C2	天然 C5a 抗原 (9-17ng/mL), 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	0.6mL×1 瓶
提取质控品	Ev-NC	辣根过氧化物酶、蔗糖、小牛血清;	0.4mL×1 瓶
	Ev-PC	标记了辣根过氧化物酶的 293T 细胞外泌体、蔗糖、小牛血清;	0.4mL×1 瓶
检测质控品	OC-NC	天然 CA125 抗原, 重组 HE4 抗原, 天然 C5a 抗原, 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂;	1.6mL×1 瓶
	OC-PC	天然 CA125 抗原, 重组 HE4 抗原, 天然 C5a 抗原, 牛血清白蛋白, 缓冲液, 防腐剂。	1.6mL×1 瓶

注：不同批号试剂盒中各组分不可互换，混用。

## (二) 产品预期用途

本产品用于体外测定人血清外泌体中的 CA125, HE4 和 C5a 浓度, 并经给定的计算公式计算后得到受试者罹患上皮性卵巢癌的评估分值 (Ovarian Cancer Scroe, OCS)。

本产品用于临床上发现有附件包块的妇女患者,用于上皮性卵巢癌的辅助诊断。

本产品不适用于健康人群的筛查。

### (三) 产品包装规格

100 人份/盒。

### (四) 产品检验原理

基于磷脂双分子层亲疏水性原理采用试剂盒中的试剂 Ex 和试剂 Ly 对血清样本中的外泌体蛋白进行提取,提取后释放的蛋白可用于进一步体外检测。本产品组份分别用于测定经提取的血清外泌体中的 CA125、HE4 和 C5a 三个标志物。反应原理为双抗体夹心法,其中 CA125 和 HE4 测定采用双试剂,一株抗体直接包被于磁微粒表面,另一株抗体以吡啶盐进行标记; C5a 测定采用三试剂,一株抗体与生物素相偶联,在反应中与链霉亲和素包被的磁微粒连接,另一株抗体以吡啶盐做标记。测试过程中,抗体对分别与样本中的 CA125、HE4 和 C5a 形成夹心复合物,经过洗涤后加入激发液,吡啶盐随即产生光子信号。相对发光单位 (RLU) 数值与待测物的浓度成正比例相关,因此通过批特异的信号-浓度主曲线可由仪器自动计算 CA125、HE4 和 C5a 的浓度。

根据计算得到的样本中 CA125、HE4 和 C5a 的浓度,由仪器自动根据公式 (1) 计算得到 OCS 值,提示受试者附件包块的良恶性。

$$OCS = \frac{e^y}{1+e^y} \dots\dots\dots (1)$$

## 二、临床前研究概述

### (一) 主要原材料

#### 1. 主要原材料的选择

主要原材料包括 CA125 抗体、HE4 抗体、C5a 抗体、CA125 抗原、HE4 抗原、C5a 抗原、提取试剂、辣根过氧化物酶标记链霉亲和素。这些原材料均为外购方式获得。

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最佳的主要原材料和供应商,制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

#### 2. 企业参考品和质控品设置情况

本产品企业参考品包括准确度参考品,空白限参考品,检出限/定量限参考品,线性参考品、重复性参考品。企业参考品均来源于临床血清/混合血清。具体如下:

空白限参考品 1 份: 由去外泌体的混合血清样本制备而成。

检出限/定量限参考品 3 份: 分别由各个标志物的临床低值样本的血清混合制备而成。

线性参考品 3 份: 分别由各个标志物的临床高值样本的血清混合制备而成。

重复性参考品 2 份: 分别由高低浓度水平的临床样本的混合血清制备而成。

准确度参考品 6 份 (用于回收率): 分别由各个标志物的高低浓

度水平的各 2 份混合血清制备而成。

准确度参考品（阴性参考品、阳性参考品）：3 份临床阴性样本的混合/血清，3 份临床阳性样本的混合/血清。

试剂盒设置了提取质控品和检测质控品，用于检测过程中，提取、检测和仪器的质量控制。

## （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血清加样量确定、沉淀试剂用量确定、沉淀时间/裂解时间确定、离心时间确定、孵育时间选择、洗涤次数选择、试剂加样量及激发液用量的确定；通过一系列研究，最终确定了最佳的反应体系。申请人提交了外泌体的富集效率、分离和鉴定资料，包括外泌体纯度及杂质的研究等，证明了该提取纯化方式对于外泌体提纯待测物的可靠性和合理性。通过对试剂及组件的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳生产工艺。

## （三）分析性能评估

分析性能评估内容包括：外观及装量、准确度（回收率、阴阳性符合率）、空白限、检出限、定量限、精密度、线性、分析特异性等的评估；提取组分的性能研究。

准确度研究中，使用 3 批成品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，进行回收率的检测研究，结果显示：三批试剂检测样本的回收率均介于 85%-115%之间，且比例系统误差均小于 5%。

精密度研究使用 3 批成品试剂盒对样本进行检测,对 3 批试剂盒的批次内、批次间、日间、实验室间、仪器间及不同操作者间的精密度进行了评价。研究结果显示:检测高值水平样本结果 OCS 值均大于 0.85,检测低值水平样本结果 OCS 值均小于 0.3。检测结果重复性和再现性均小于 15.0%。

空白限的研究中,申请人对样本进行每天 20 次检测,连续检测三天的结果进行非参数统计分析,初步确定了空白限:CA125 为不高于 0.5U/mL,HE4 为不高于 0.5pmol/L, C5a 为不高于 0.2ng/mL。使用 3 批试剂盒对空白限参考品进行验证,重复 2 天。检测结果显示符合空白限要求。

检出限的研究,申请人对检出限参考品用样本进行稀释为多个理论浓度样本,对其进行检测,重复 3 天。得到的数据进行非参数统计分析,初步确定了检出限:CA125 为不高于 0.9U/mL,HE4 为不高于 0.9pmol/L, C5a 为不高于 0.7ng/mL。使用 3 批试剂盒对检测限参考品进行验证,重复 3 天,检测结果显示符合检出限要求。

定量限的研究,申请人对样本进行稀释为多个理论浓度样本,对其进行检测并采用维斯特加德 (Westgard model) 方法计算各样本的总误差,初步确定了定量限:CA125 为不高于 1.5U/mL,HE4 为不高于 1.5pmol/L, C5a 为不高于 1.5ng/mL。使用 3 批试剂盒对定量限参考品进行验证,重复检测 3 天,检测结果符合定量限要求。

线性研究中,申请人对相应的样本进行梯度稀释 S1-S11。对其

进行检测，每个样本重复检测 4 次，进行多项式回归分析，初步确定具有线性。用 3 批合格的成品试剂盒对线性参考品进行验证，重复 2 次。检测结果显示：在相应的线性范围内，线性相关系数  $r$  均大于 0.9900，绝对偏差、相对偏差均符合线性要求。

分析特异性研究包括交叉反应研究和干扰研究。

交叉反应研究包括肿瘤标记物、其他补体及免疫相关的研究。结果显示：596ng/mL 的 HAMA 血清样本、RF 浓度为 500IU/mL 的血清样本、SSA 浓度为 6447U/mL 的血清样本、SSB 浓度为 763U/mL 的血清样本、Sm（史密斯）浓度为 171.6U/mL 及 Sm/RNP 浓度为 209.86U/mL 的血清样本、dsDNA 为 212U/mL 及 ssDNA 浓度为 225.6U/mL 的血清样本、HCG 浓度为 20000mIU/mL、C5b 浓度为 2330ng/mL、C1 浓度为 2000ng/mL、C2 浓度为 2000ng/mL 等，均未显示出交叉反应性。

干扰研究结果显示：样本中含有以下干扰物：一定浓度的甘油三酯混合物（3000mg/dL）、胆红素（40mg/dL）、血红蛋白（500 mg/dL）、顺铂（180  $\mu$ g/mL）、甲氨蝶呤（180  $\mu$ g/mL）、紫杉醇（265  $\mu$ g/mL）对检测结果均无影响。

申请人对提取试剂组分的性能及提取后提取物的质量控制进行研究，研究结果表明：提取组分、提取物均符合检测需求。

#### （四）阳性判断值研究

阳性判断值的建立研究选取了 306 例附件包块临床样本，这些样本涵盖卵巢上皮性癌/输卵管癌、卵巢非上皮性癌、卵巢良性肿瘤、

卵巢交界性肿瘤、卵巢囊肿、附件炎症、干扰等临床常见疾病。对三个标志物进行构建模型，对三指标进行自然对数处理后，通过逻辑回归的方式得到各自然变量系数，从而确定三指标的拟合公式。将 306 例样本的检测结果代入公式，计算得到 OCS 值，通过受试者特征(ROC)曲线分析确定试剂盒的阳性判断值。再用 130 例临床样本对阳性判断值进行验证，结果显示既定的阳性判断值符合预期适用人群的判定。最终确定本产品的阳性判断值。

### **(五) 稳定性研究**

产品稳定性研究包括：实时稳定性、运输稳定性、使用稳定性。

实时稳定性：将 3 批试剂盒储存于 2-8℃ 条件下，分别于第 0、3、6、9、12、14 个月时，对试剂进行物理性能、准确性、空白限、检出限、定量限、线性、重复性、批间差、质控品准确度、校准品准确度的考察。各项性能指标均符合要求，确定产品在规定的储存条件下，试剂盒效期为 12 个月。

此外，申请人对试剂盒的机载、开瓶稳定性，校准曲线稳定性及试剂盒运输稳定性等进行了研究，结果显示，产品的性能均能满足产品说明书声称的要求。

样本稳定性研究：申请人采用临床混合/血清样本、提取后的外泌体样本进行了稳定性研究，结果显示，样本的稳定性均能满足产品说明书声称的要求。

## **三、临床评价概述**

申请人在重庆大学附属肿瘤医院、中山大学孙逸仙纪念医院、浙江省肿瘤医院和郑州大学第一附属医院共 4 家机构完成了临床试验。入组患者临床上有附件包块的疑似上皮性卵巢癌患者，共计纳入 1448 例，入组人群包括各种亚型和各分期的上皮性卵巢癌患者、良性肿瘤以及良性病变等患者。1448 例样本中，阳性样本 333 例，阴性样本 1115 例。

采用试验用体外诊断试剂与临床参考标准（病理诊断）进行比较研究试验，验证本产品的临床性能。申报产品的临床灵敏度为 95.5% (95%CI: 92.7%-97.3%)，临床特异性为 85.5% (95%CI: 83.3%-87.4%)。针对 CA125 蛋白，申报产品与临床参考标准进行比较研究的临床灵敏度为 85.9% (95%CI: 81.7%-89.2%)，临床特异性为 75.3% (95%CI: 72.6%-77.7%)；针对 HE4 蛋白，申报产品与临床参考标准进行比较研究的临床灵敏度为 70.6% (95%CI: 65.5%-75.2%)，临床特异度为 96.9% (95%CI: 95.7%-97.7%)；针对 C5a 蛋白，申报产品与临床参考标准进行比较研究的临床灵敏度为 71.8% (95%CI: 66.7%-76.3%)，临床特异度为 53.5% (95%CI: 50.6%-56.5%)。同时，申报产品对不同分期的上皮性卵巢癌均有较好的临床灵敏度。

同时，对于绝经前后的人群，进行了分层统计分析。针对绝经前人群，申报产品与临床参考标准进行比较时的临床灵敏度为 94.3% (95%CI: 88.7%-97.2%)，临床特异性为 85.7% (95%CI: 83.1%-87.9%)；针对绝经后人群，申报产品与临床参考标准进行比较时的临床灵敏度

为 96.2% (95%CI: 92.7%-98.1%), 临床特异性为 84.1% (95%CI: 79.6%-87.8%)。

上述研究结果表明, 产品的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》对产品进行了风险分析。

##### (一) 受益评估

本产品适用于临床上发现有附件包块的妇女患者, 用于上皮性卵巢癌的辅助诊断。检测结果仅供临床参考, 不应作为临床诊断的唯一依据, 临床医生应结合临床表现及其他临床实验室检测指标等因素进行综合判断。其临床应用的主要受益在于: 本产品对上皮性卵巢癌的临床灵敏度为 95.5%, 临床特异度为 85.5%, 可为患者提供一种更多的上皮性卵巢癌的辅助诊断方法, 用于临床实践, 协助医生制定合理的诊疗方案。

##### (二) 风险评估

根据申请人提供的申报材料, 已知危险(源)进行了风险评估, 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/收益分析即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, 确定其风险水平是否可接受。但为保证器械安全, 基于对主要剩余风险的规避, 需要在说明书中提示以下

信息:

1. 预期用途: 本产品用于临床上发现有附件包块的妇女患者, 用于上皮性卵巢癌的辅助诊断。

本试剂盒适用于对上皮性卵巢癌的辅助诊断, 不适用于健康人群的筛查。

2. 警示及注意事项: 产品说明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

本申报项目为境内第三类体外诊断试剂产品注册,属于优先审批医疗器械。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。

2024 年 1 月 16 日

附件: 产品说明书

# 人外泌体 CA125、HE4、C5a 检测试剂盒（化学发光法） 使用说明书

## 【产品名称】

通用名称：人外泌体 CA125、HE4、C5a 检测试剂盒（化学发光法）

## 【包装规格】

100 人份/盒

## 【预期用途】

本产品用于体外测定人血清外泌体中的 CA125，HE4 和 C5a 浓度，并给定的计算公式计算后得到受试者罹患上皮性卵巢癌的评估分值（Ovarian Cancer Score, OCS）。

本产品用于临床上发现有附件包块的妇女患者，用于上皮性卵巢癌的辅助诊断。

本产品不适用于健康人群的筛查。

CA125 是一种分子量大于 200KD 的糖蛋白<sup>[1]</sup>，属于表面抗原，与上皮卵巢癌抗原有关。在患上皮源性卵巢癌的妇女中，超过 80% 的患者 CA125 浓度 >35U/mL 的临界值，因此 CA125 的检测对卵巢癌的诊断和治疗有很大的指导意义<sup>[2]</sup>。

CA125 也可作为绝经后女性良、恶性盆腔肿块的辅助鉴别指标<sup>[3]</sup>。有研究表明，卵巢恶性肿瘤/子宫内膜异位症、盆腔炎性肿块患者血清 CA125 的阳性率分别为 54.6%、50.0%、37.5%<sup>[4]</sup>。

健康人群中存在 1%~2% 存在 CA125 值升高，这部分人群中 5% 为良性疾病，28% 为非妇科系统肿瘤。心功能衰竭、肝硬化、慢性活动性肝炎的患者，也可能出现 CA125 的升高<sup>[5]</sup>。

HE4 基因又称为 WFDC2（Whey acidic four-disulfide core domain protein 2），由 5 个外显子和 4 个内含子组成，根据初始转录本剪接方式的不同，产生 5 种亚型。HE4 主要由 WAP（whey Acidic Protein）类型的二硫键核心构成，分子量为 13KD，等电点为 4.3，经糖基化修饰后分子量可达 25KD<sup>[6]</sup>。

HE4 主要分布于生殖系统上皮，如附睾、曲细精管、输精管上皮、输卵管上皮和子宫内膜；此外，在其他一些组织的导管和腺上皮也有表达，其中支气管和腮腺表达较高，乳腺导管、甲状腺、肾远曲小管、前列腺、结肠黏膜部分表达<sup>[7]</sup>。

在恶性肿瘤中，HE4 的表达水平最高的是卵巢浆液性癌，肺腺癌次之，而肺鳞癌表达较低；子宫内膜癌、移行细胞癌、乳腺癌、胰腺癌都有中等水平的表达，但是它们之中也有个别相当于卵巢浆液性癌的表达水平。结肠癌、胃癌、肝癌、前列腺癌中大部分呈低水平的表达<sup>[8][9]</sup>。

补体系统由 30 多种广泛存在于血清、组织液和细胞膜表面的蛋白组成，是具有精密调控机制的蛋白反应系统，其主要生理功能为增强吞噬作用、增

强吞噬细胞的趋化性、增强血管通透性、中和病毒、细胞溶解及免疫反应调节等。补体系统还能促进 B 细胞对肿瘤细胞分泌的可溶性抗原或膜表达抗原产生应答，并产生抗癌抗体，进而抑制肿瘤的生成、发展<sup>[10]</sup>。

补体成分 5 (C5) 是补体系统中的一种重要组份。C5 前体蛋白由  $\alpha$ 、 $\beta$  两条多肽链组成，分子量为 190kDa。C5 前体蛋白无活性，但在 C5 转化酶的作用下， $\alpha$  链 N 末端裂解出一个分子量为 8.3kDa 的螺旋小片段即 C5a 进入液相中，其余部分为 C5b，仍结合在细胞膜表面<sup>[11][12]</sup>。

C5a 可发挥过敏毒素、细胞趋化、促代谢、免疫调节等多种生物学功能。C5a 对免疫应答有明显的增强作用，可诱导单核细胞分泌白细胞介素 IL1、IL6、IL8 及肿瘤坏死因子等细胞因子，促进抗原及同种异体抗原诱导的 T 细胞增殖及 B 细胞产生抗体等<sup>[13]</sup>。对肿瘤组织的体外研究发现，C5a 能促进巨噬细胞系 Raw264.7 MAPK 通路中 P38 的磷酸化水平及纤维介素蛋白-2 凝血酶原酶 (FGL2) 的产生能力，进而参与肿瘤的发病过程<sup>[14]</sup>。

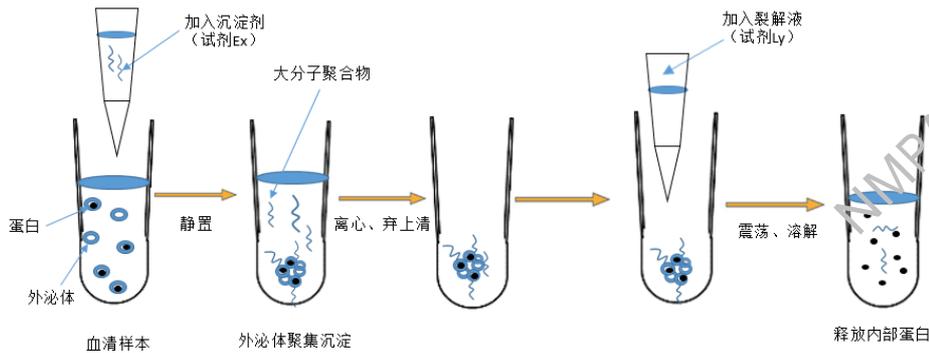
外泌体(exosomes)是一种所有细胞都释放的胞外囊泡，其直径为 30~150 nm。外泌体包含了 DNA、RNA 和蛋白质等内容物，能够被细胞分泌至血液循环中；外泌体可在肿瘤微环境中检测到，越来越多的证据表明外泌体在促进肿瘤生长中起到重要作用，其参与血管生成、免疫应答和肿瘤转移等活动<sup>[15]</sup>。有研究利用 ELISA 来检测、描述和定量外泌体，发现了病人外泌体当中有些蛋白比健康人群表达量要高很多。人体内分泌的外泌体具有很高的特异性，体液中分泌的外泌体所包含的信息，可能比体液中包含的信息更具有代表性<sup>[16][17]</sup>。外泌体可用来筛选生物标志物，因为在外泌体分选期间，高度选择的标志物会在外泌体中富集<sup>[18]</sup>，因此，对于传统的血清肿瘤标志物，也可以从外泌体中进行提取并检测，获得的生理信息对肿瘤的辅助诊断有着更高的临床价值。

### 【检验原理】

本试剂盒提供的检测方法学基于三个主要过程：

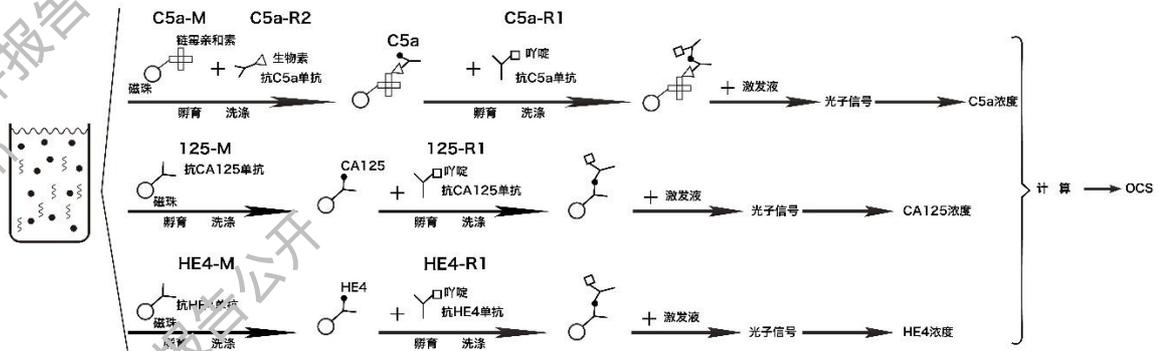
#### [1] 样品处理

基于磷脂双分子层亲疏水性原理采用试剂盒中的试剂 Ex 和试剂 Ly 对血清样本中的外泌体蛋白进行提取，血清样本经滤膜过滤去除细胞碎片等杂质，加入试剂 Ex 混匀静置，使样本中的外泌体聚集沉降，再通过离心分离去除血清，最后用试剂 Ly 对沉淀中的外泌体进行裂解和再溶解，外泌体裂解后释放的蛋白可用于进一步体外检测。如下图：



### [2] 化学发光免疫测定

本产品组份分别用于测定经提取的血清外泌体中的 CA125、HE4 和 C5a 三个标志物。反应原理为双抗体夹心法，其中 CA125 和 HE4 测定采用双试剂，一株抗体直接包被于磁微粒表面，另一株抗体以吖啶盐进行标记；C5a 测定采用三试剂，一株抗体与生物素相偶联，在反应中与链霉亲和素包被的磁微粒连接，另一株抗体以吖啶盐做标记。测试过程中，抗体对分别与样本中的 CA125、HE4 和 C5a 形成夹心复合物，经过洗涤后加入激发液，吖啶盐随即产生光子信号。相对发光单位（RLU）数值与待测物的浓度成正比例相关，因此通过批特异的信号-浓度主曲线可由仪器自动计算 CA125、HE4 和 C5a 的浓度。如图：



### [3] 分值计算

根据计算得到的样本中 CA125、HE4 和 C5a 的浓度，由仪器自动根据公式 (1) 计算得到 OCS 值，提示受试者附件包块的良恶性。

$$OCS = \frac{e^y}{1+e^y} \dots \dots \dots (1)$$

### 【主要组成成分】

组份	名称	主要组成成分	数量
提取	试剂Ex	高分子聚合物钠盐；	12.0mL×1 瓶

组份	名称	主要组成成分	数量
试剂	试剂 Ly	表面活性剂、磷酸钠盐；	75.0mL×1 瓶
CA125 试剂组	125-M	抗 CA125 鼠单抗包被的磁微粒，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
	125-R1	吡啶盐标记的抗 CA125 鼠单抗，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
HE4 试剂组	HE4-M	抗 HE4 鼠单抗包被的磁微粒，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
	HE4-R1	吡啶盐标记的抗 HE4 鼠单抗，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
C5a 试剂组	C5a-M	链霉亲和素包被的磁微粒，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
	C5a-R1	吡啶盐标记的抗 C5a 鼠单抗，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
	C5a-R2	生物素化的抗 C5a 鼠单抗，牛血清白蛋白缓冲液，防腐剂；	6.0mL×1 瓶
校准品	CA125-C1	天然 CA125 抗原 (0.5-5U/mL)，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	0.6mL×1 瓶
	CA125-C2	天然 CA125 抗原 (7-14U/mL)，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	0.6mL×1 瓶
	HE4-C1	重组 HE4 抗原 (0.5-5pmol/L)，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	0.6mL×1 瓶
	HE4-C2	重组 HE4 抗原 (7-14pmol/L)，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	0.6mL×1 瓶
	C5a-C1	天然 C5a 抗原 (1-6ng/mL)，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	0.6mL×1 瓶
	C5a-C2	天然 C5a 抗原 (9-17ng/mL)，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	0.6mL×1 瓶
提取质控品	Ev-NC	辣根过氧化物酶、蔗糖、小牛血清；	0.4mL×1 瓶
	Ev-PC	标记了辣根过氧化物酶的 293T 细胞外泌体、蔗糖、小牛血清；	0.4mL×1 瓶
检测质控品	OC-NC	天然 CA125 抗原，重组 HE4 抗原，天然 C5a 抗原，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂；	1.6mL×1 瓶
	OC-PC	天然 CA125 抗原，重组 HE4 抗原，天然 C5a 抗原，牛血清白蛋白，缓冲液，防腐剂。	1.6mL×1 瓶

注： 1.校准品量值溯源至企业标准品；  
2.不同批号试剂盒中各组分不可互换、混用；  
3.提取质控品经显色反应后，Ev-NC 应为无色，Ev-PC 应为黄色；检测质控品测定结果的 OCS 值，见质控品信息卡。

- 其他需要但未提供的材料：

1. 清洗液（上海思路迪生物医学科技有限公司，备案号：沪闵械备 20190089 号）；
2. 激发液（上海思路迪生物医学科技有限公司，备案号：沪闵械备 20190092 号）；
3. 全自动免疫检验系统用底物液（上海思路迪生物医学科技有限公司，备案号：沪闵械备 20230034）；
4. 设备：离心机，水平震荡仪；
5. 实验耗材：96 孔滤板（滤孔孔径为 0.2 $\mu$ m，推荐使用品牌：PALL Life Science），96 孔深孔板（接收板）。

### 【储存条件及有效期】

1. 未开封试剂盒，2~8 $^{\circ}$ C 储存，避免冷冻，有效期 12 个月；
2. 开封后试剂盒，2~8 $^{\circ}$ C 储存，避免冷冻，有效期 28 天；
3. 校准品和检测质控品（OC-NC 和 OC-PC）开瓶后 28 天内稳定；提取质控品 Ev-NC 和 Ev-PC 复溶后在 2-8 $^{\circ}$ C 可保存 3 天，不可冻融；
4. 生产日期，使用期限或者失效日期：见标签。
5. 试剂盒上机有效期定为 28 天；建议同一试剂盒的校准周期不超过 5 天，同一批次试剂盒的校准周期不超过 28 天。

### 【适用仪器】

全自动化学发光测定仪，型号 SMART 6500，重庆科斯迈生物技术有限公司生产。

### 【样本要求】

1. 适用于血清样本。常规采血后分离血清，样本采集中所用的注射器、离心管和吸头均为一次性用品。
2. 已分离的血清样本在 2~8 $^{\circ}$ C 可保存 3 天，在 -20 $^{\circ}$ C 以下保存 6 个月，更长时间需在 -70 $^{\circ}$ C 及以下，冻融不超过 3 次。冻存样本请在室温下复融，并充分混匀，若发现样本中有絮状物，须离心后取上清液备用。
3. 准备不少于 0.5 ml 的血清样本用于提取外泌体，若需对提取后的样本进行复测，每增加 1 次测试数，需按比例增加血清样本量。
4. 血清外泌体提取后可在 2~8 $^{\circ}$ C 保存不超过 3 天，在 -20 $^{\circ}$ C 以下保存不超过 6 个月。

### 【检验方法】

#### ● 样本处理：

#### 1. 样本过滤

- 1.1. 如果是解冻样品，需要轻柔颠倒混匀 5-10 次，避免使用旋涡震荡等剧烈混匀方式。

1.2. 将血清样本加入推荐品牌的 96 孔滤板中，过滤使血清样本从滤板中全部滤下。

## 2. 外泌体沉淀

2.1. 取适量经过滤的血清样本于另一洁净 96 孔深孔接收板中，加入 25% 血清体积的试剂 Ex（如取过滤后血清样本 100 $\mu$ L，则加入 25 $\mu$ L 试剂 Ex）；

2.2. 将 96 孔深孔板置于水平震荡仪上震荡（若无法混匀，则可用移液器进行吹打混匀），然后于室温静置 30 分钟；

2.3. 将 96 孔深孔板放入板式离心机中，4 $^{\circ}$ C 4700 $\times$ g 离心 10 分钟（或 4 $^{\circ}$ C 2200 $\times$ g 离心 20 分钟），拍掉上清；

2.4. 96 孔深孔板底部的沉淀即为提取的外泌体囊泡。

## 3. 外泌体裂解

3.1. 向 96 深孔板底部的沉淀中加入与样本起始量等体积的试剂 Ly（如 2.1 中取 100 $\mu$ L 过滤后血清样本，则加入 100 $\mu$ L 试剂 Ly），于水平震荡仪上震荡不少于 30 分钟至目视（光照充足的条件下）沉淀全部溶解（若有沉淀未裂解，可用移液器进行吹打使沉淀裂解完全），液体澄清透明；

3.2. 将经裂解的溶液全部转移至 96 孔滤板中，过滤至 96 孔深孔接收板中，滤液即外泌体蛋白提取液，可用于后续蛋白检测。

## 4. 检测样本准备

4.1. 单次测定所需的外泌体蛋白提取液不得低于 350 $\mu$ L，每增加 1 次测定，需再增加 110 $\mu$ L。

4.2. 样本、校准品及质控品在使用前请混匀，再放入对应的样本架，放置时请勿遮挡条码。

### ● 试剂准备：

1. 使用前分别适度摇晃三个试剂组件以混匀试剂，并目测确认 C5a-M、125-M 和 HE4-M 中的磁微粒完全悬浮。

2. 确认各试剂瓶中无气泡后进行操作。

3. 试剂装载（可参考全自动化学发光测定仪，型号 SMART 6500 产品操作指南进行）：

可通过手动扫码或自动扫码的方式进行试剂信息载入。

#### ➢ 手动扫码：

1) 选定试剂位后用扫码枪读入试剂标签上的二维码信息，并根据提示完成试剂装载。

#### ➢ 自动扫码（选配功能）：

1) 试剂装载至仪器中后由仪器自动读取信息。

### ● 测定：

1. 给待测样本或质控分配三个测试项目。

2. 仪器开始测定流程，并自动计算结果。过程中可继续添加新的测试样本。

(可参考全自动化学发光测定仪, 型号 SMART 6500 产品操作指南进行)

## ● 校准

1. 进行校准操作时, 请将各校准品均测定三次, 仪器将自动生成相应的校准曲线。
2. 以下情况需要用校准品进行重新校准:  
使用新批号的试剂盒时;  
同一盒试剂使用超过 5 天;  
同一批号的试剂使用超过 28 天;  
质控品 OC-NC 和 OC-PC 的检测结果与规定不符时;  
仪器修理, 软件升级等硬件、软件发生变动的情况。

## ● 结果计算:

仪器自动计算样本中 CA125、HE4 和 C5a 的浓度, 单位分别是 U/mL、pmol/L 和 ng/mL, 同时进一步计算 OCS, 并在“OCS”项目后进行提示。

## ● 质量控制:

1. 完成外泌体提取和裂解的提取液在光照充足下目视检查, 沉淀应全部溶解且液体澄清透明。
2. 本试剂盒提供一对提取质控品(Ev-NC 和 Ev-PC)和一对检测质控品(OC-NC 和 OC-PC) 分别用于外泌体提取过程和化学发光检测过程中的质量控制;
3. Ev-NC 和 Ev-PC 的使用:
  - 3.1. 打开 Ev-NC 和 Ev-PC 的瓶盖和胶塞, 分别添加 400  $\mu$ L 纯化水, 盖上胶塞静置 10 分钟以上, 再轻摇瓶身使固体完全溶解, 液体呈黄色澄清透明;
  - 3.2. 按照样本过滤、外泌体沉淀、外泌体裂解各步操作说明完成对 Ev-NC 和 Ev-PC 的样本处理;
  - 3.3. 分别吸取 100 $\mu$ L 的 Ev-NC 和 Ev-PC 的提取液至接收板孔或其它透明样本容器中, 再向提取液各添加 50 $\mu$ L 全自动免疫检验系统用底物液的显色液, 静置 1 分钟后添加终止液 50 $\mu$ L;
  - 3.4. 提取质控品结果的判读:  
观察 Ev-NC 和 Ev-PC 的板孔中的颜色:
    - 3.4.1. Ev-NC 无色、Ev-PC 显亮黄色则说明提取成功;
    - 3.4.2. Ev-NC 若显色说明有游离的辣根过氧化物酶残留, 上清去除不够干净;
    - 3.4.3. Ev-PC 不显色则说明样品中的外泌体未被足量沉淀或裂解不彻底, 应检查沉淀剂添加量是否正确或裂解时间是否满足要求。
4. OC-NC 和 OC-PC 的使用:
  - 4.1. 将 OC-NC 和 OC-PC 作为样本加载检测, OCS 检测结果应分别为“-”和“+”, 否则相关样本的结果无效, 须重新检测。
  - 4.2. 检测时, 若距离前一次测定时间超过 24 小时, 建议再次测定质控品 OC-NC 和 OC-PC, 或遵照各实验室的质控要求执行。

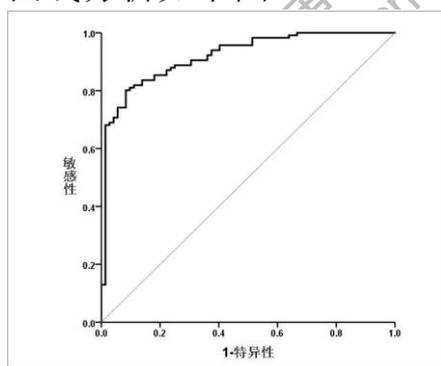
## ● 样本的稀释:

1. 血清样本在提取外泌体之前不可用任何人工基质进行稀释。

2. 部分样本可能因高脂等原因使过滤效率降低，滤过体积减少而获得的提取液较少时，可使用试剂 Ly 对提取液稀释后检测，稀释倍数不得超过 5 倍。
3. 稀释后的样本，测定时应选择样本手动预稀释模式并输入正确的稀释倍数后再开始检测，检测结果将自动按照稀释倍数进行换算。

### 【参考区间】

本公司对 306 例良性及上皮性恶性卵巢肿瘤女性样本的测定结果进行 ROC 曲线分析如下图：



当取 OCS 为 0.506 时得到的上皮性卵巢癌敏感性为 0.87，特异性为 0.89。建议各实验室根据各地区的人群分布建立适宜的参考范围。

### 【检验结果的解释】

1. 本试剂盒各测定组件的检测范围：
  - 1) CA125: 0.9-300U/mL。测定结果高于 300U/mL 时，报告为“>300U/mL”，测定结果低于 0.9U/mL 时，报告为“<0.9U/mL”。
  - 2) HE4: 0.9-300pmol/L。测定结果高于 300pmol/L 时，报告为“>300pmol/L”，测定结果低于 0.9 pmol/L 时，报告为“<0.9 pmol/L”。
  - 3) C5a: 0.7-40ng/mL。测定结果高于 40ng/mL 时，报告为“>40ng/mL”；测定结果低于 0.7ng/mL 时，报告为“<0.7ng/mL”。
- 4) 报告中单个指标测定结果不提示任何临床意义。
- 5) 计算分值  $OCS \geq 0.506$  时，报告为阳性“+”，提示病人体内的罹患上皮性卵巢癌的可能性较大； $OCS < 0.506$  时，报告为阴性“-”，则提示为上皮性卵巢癌的可能性较小，即为良性肿瘤的可能性较大。

### 【检验方法的局限性】

1. 本产品检测结果仅供体外辅助诊断参考，不作为临床诊治的唯一依据，对患者的临床处置应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查等诊疗标准综合考虑。
2. 长期接触动物或动物血清制品以及接受过鼠单克隆抗体药物治疗的人群，体内可能产生的异嗜性抗体也会出现在外泌体中，并随着目标蛋白被提取。这些异嗜性抗体会和免疫球蛋白反应，可能存在干扰，导致测值不准确。
3. 请勿用本试剂盒直接检测血清样本，否则得出的 OCS 结果不具临床意义。
4. 本试剂盒中包含的 C5a、CA125 和 HE4 定量组分，不可用于血清 C5a、CA125

- 和 HE4 的测定并依此出具血清肿瘤标志物的检验报告。
5. 尚未验证本试剂盒对非上皮性卵巢癌的其他附件恶性肿瘤的适用性。

### 【产品性能指标】

- 空白限：  
CA125：不高于 0.5U/mL；  
HE4：不高于 0.5pmol/L；  
C5a：不高于 0.2ng/mL。
- 检出限：  
CA125：不高于 0.9U/mL；  
HE4：不高于 0.9pmol/L；  
C5a：不高于 0.7ng/mL。
- 定量限：  
CA125：不高于 1.5U/mL；  
HE4：不高于 1.5pmol/L；  
C5a：不高于 1.5ng/mL。
- 准确性：  
检测企业阳性参考品，分值 OCS 应 $\geq 0.506$ ，报告为阳性“+”；  
检测企业阴性参考品，分值 OCS 应 $< 0.506$ ，报告为阴性“-”；  
CA125，HE4 和 C5a 浓度测定的回收率在 85%~115%之间。
- 重复性：  
重复测定含有低浓度 CA125、HE4 和 C5a 的样本 10 次，3 个指标测定结果的变异系数（CV）均不大于 8%，10 次结果的 OCS 计算报告结果均为阴性“-”。  
重复测定含有高浓度 CA125、HE4 和 C5a 的样本 10 次，3 个指标测定结果的变异系数（CV）均不大于 8%，10 次结果的 OCS 计算报告结果均为阳性“+”。
- 线性范围：  
CA125：在 1.5-300U/mL 范围内，线性相关系数  $r \geq 0.9900$ ；  
HE4：在 1.5-300pmol/L 范围内，线性相关系数  $r \geq 0.9900$ ；  
C5a：在 1.5-40ng/mL 范围内，线性相关系数  $r \geq 0.9900$ 。
- 特异性研究

本产品通过测试以下浓度的干扰物，结果未受影响：

名称	测试浓度
甘油三酯混合物	3000mg/dL
胆红素	40mg/dL
血红蛋白	500 mg/dL
顺铂	180 $\mu$ g/mL
甲氨蝶呤	180 $\mu$ g/mL
紫杉醇	265 $\mu$ g/mL

本产品通过测试以下物质及浓度的交叉反应，结果未受影响：

名称	测试浓度
HAMA (人抗鼠抗体)	596ng/mL
RF (类风湿因子)	500IU/mL
抗 SSA 抗核抗体	6447U/mL
抗 SSB 抗核抗体	763U/mL
抗 Sm/RNP 抗核抗体	209.86U/mL
抗 dsDNA 抗体	212U/mL
抗 ssDNA 抗体	225.6U/mL
AFP	1000ng/mL
HCG	20000mIU/mL
C5b	2330ng/mL
C1	2000ng/mL
C1q	2000ng/mL
C2	2000ng/mL
C3	2000ng/mL
C3a	2000ng/mL
C3b	2000ng/mL
C5	2000ng/mL
C6	2000ng/mL
Factor D	2000ng/mL

8. 临床试验：本次临床试验共在 4 家临床机构开展，临床试验共计入组有效病例 1448 例。分析结果显示，本试剂盒检测结果与对比方法（临床参考标准：病理诊断）结果相比，临床灵敏度为 95.5%，临床特异度为 85.5%，表明考核试剂检测结果与临床参考标准结果一致性较好。

#### 【注意事项】

1. 试剂盒中的定量组分不应单独用于血清相关标志物的检测，检测结果也不提示任何临床意义。
2. 磁珠试剂使用前必须确认处于混匀状态。
3. 样本及试剂在操作过程中请避免产生气泡，如果出现气泡，请用洁净的棉棒或移液枪除去。
4. 由于本试剂盒的检测对象为人血清，可能带有致病病原体，所以应按传染病实验室要求操作。
5. 实验室产生的所有废弃物，应按照《实验室生物安全通用要求》（GB 19489-2008）和《医疗机构消毒技术规范》（WS/T 367-2012）处置实验室废弃物，包括不再需要的样本、培养物和其它物品，均应视为感染性废弃物，应置于专用的密封防漏容器中，安全运至消毒室，经高压消毒后再进行处理或废弃。
6. 试剂盒中的部分组份含有的牛源性材料，来自于国家许可的供货来源。但根据国食药监械[2006]407 号《关于含有牛、羊源性材料医疗器械注册有关事宜的公告》的提示，牛源性材料对于运输人员和使用者有一定的潜在风险，因此相关人员应做好必要的安全防护工作，避免试剂与皮肤的直接接触。
7. 试剂盒校准品中含有人源组分 CA125 和 C5a 抗原，虽已经通过了 HBs-Ag、HIV1/2-Ab、HCV-Ab 等项目的检测。但操作时，仍应严格按照实验室操作规范进行操作，采取防护措施。如：佩戴一次性手套、着实验室工作服等。
8. 本试剂中含有防腐成分，切勿吞咽，避免与皮肤及粘膜接触。如不慎接触，

应用大量清水冲洗；如误服，应立即上医院诊治。

9. 本产品仅供专业人员做体外诊断使用。

### 【参考文献】

1. Bast RC Jr, Feeney M, Lazarus H, et al. Reactivity of a Monoclonal Antibody with Human Ovarian Carcinoma. *J Clin Invest* 1981;68:1331-7.
2. 王宜生. CA125 升高患者的良恶性鉴别方法研究[D]. 上海：复旦大学 2012.
3. NIH Consensus Conference, Ovarian Cancer: Screening, Treatment, and Follow-up. *JAMA* 1995;273:491-7.
4. 王芬, 阿也提. 两种肿瘤标志物的测定对鉴别妇科盆腔肿块的意义[J]. 中国医师杂志, 2011.13(3)
5. O'Brien TJ, Beard JB, Underwood LJ, et al. The CA 125 Gene: An Extracellular Superstructure Dominated by Repeat Sequences. *Tumor Biol* 2001;22:348-366.
6. Bingle L, et al. The putative ovarian tumour marker gene HE4(WFDC2), is expressed in normal tissues and undergoes complex alternative splicing to yield multiple protein isoforms. *Oncogene* 2002, 21(17): 2768-2773.
7. 杨彩虹, 张雪玉. 人附睾蛋白 4 在妇科恶性肿瘤中的研究进展. 医学综述 2010, 16(20): 3081-3083
8. Ling Hua, et al. Expression and biochemical characterization of recombinant human epididymis protein 4. *Protein Expression and Purification* 2014, 102: 52-612
9. 管桂锋. OPN 及 HE4 基因在上皮性卵巢癌中的表达及临床意义. 医药论坛杂志. 2009, 30(10): 9-13
10. 宁波. 肿瘤免疫与肿瘤免疫逃逸机制[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2000, 16(6): 339- 340
11. 李娜, 王长法, 等. 补体 C5 研究进展. 家畜生态学报 2011,32(5):1673-1182
12. 王会会, 陈国江. 黎燕, 等. 补体 C5a、C5a 受体及其拮抗剂的研究进展[J]. 国际药学研究杂志, 2010, 37(3): 181—186.
13. Guo R F, Ward P A. Role of C5a in inflammatory responses[J]. *Annual Review of immunology*, 2005. 23: 821-852.
14. 陈立颖, 朱莹, 等. 结肠癌组织中补体 C5a/C5aR 通路活化上调 FGL2 的表达[J]. 第三军医大学学报, 2016,6(6):575-579 .
15. Theresa L. Whiteside (2016), Tumor-Derived Exosomes and Their Role in Cancer Progression. *Advances in Clinical Chemistry*, 103-141.
16. Logozzi M, De Milito A, Lugini L et al. High levels of exosomes expressing CD63 and caveolin-1 in plasma of melanoma patients. *PLoS ONE* 4,2009, (4), e5219.

17. Francesca Properzi, Mariantonia Logozzi & Stefano Fais, Exosomes: the future of biomarkers in medicine, Biomarkers Med,2013,7(5), 769–778.
18. Jin Lin,<sup>1</sup> Jing Li,<sup>2</sup> Bo Huang et al, Exosomes: Novel Biomarkers for Clinical Diagnosis, The Scientific World Journal,2015.

**【基本信息】**

注册人/生产企业名称：上海思路迪生物医学科技有限公司

住所：上海市闵行区新骏环路 158 号 2 号楼 304 室、404 室、402 室、401 室

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：上海市闵行区新骏环路 158 号 2 幢 304 室、404 室、402 室

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】**