

受理号：CSZ2000117

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：Septin9/SDC2/BCAT1 基因甲基化检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：北京艾克伦医疗科技有限公司

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.....	13
四、 产品受益风险判定.....	14
综合评价意见.....	17

基本信息

一、申请人名称

北京艾克伦医疗科技有限公司

二、申请人住所

北京市昌平区科技园区白浮泉路 10 号 2 号楼北控科技大厦
3 层 302 室

三、生产地址

北京市昌平区科技园区白浮泉路 10 号 2 号楼北控科技大厦
3 层 302 室、北京市昌平区超前路 37 号 1 幢 4 层 5-4-2-01

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:

试剂组分	主要成分	体积/数量
1.PCR 反应液	热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl ₂	0.6mlx2
2.引物混合液	引物、探针	0.24mlx1
3.阴性质控品	人类基因组 DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1
4.阳性质控品	人类基因组 DNA、Hela 细胞基因组 DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人外周血血浆中 Septin9、SDC2、BCAT1 基因的甲基化。

病人外周血中甲基化的 Septin9、SDC2、BCAT1 基因可以通过 DNA 的特异扩增而被检测到。本试剂盒适用于临床医师建议做肠镜检查，但因病人依从性差或其它医学原因无法做肠镜检查患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，不能用于普通人群的肿瘤筛查。本产品仅作为原发性结直肠癌的辅助诊断供临床医师参考。

Septin9（胞裂蛋白 9）是高度保守的三磷酸鸟苷结合蛋白

septin 家族成员之一，广泛存在于人体细胞，具有重要的肿瘤抑制作用，其甲基化被证实与结直肠癌的发生密切相关。SDC2（多配体蛋白聚糖-2）在结肠间充质细胞中表达，参与细胞增殖、细胞迁移和细胞-基质相互作用，可以通过多种途径抑制肿瘤形成。BCAT1（支链氨基酸转移酶 1）为原癌基因 MYC 直接调控的下游靶基因之一，其表观遗传沉默可导致 Wnt 信号激活，诱导肿瘤发生。研究发现，结直肠癌患者血浆样本中 Septin9、SDC2 及 BCAT1 三基因启动子区域呈高度甲基化。甲基化可导致基因转录受到抑制，从而影响基因的正常表达，并使其抑癌功能丧失。

（三）产品包装规格

30 人份/盒。

（四）产品检验原理

提取血浆中的游离 DNA，然后用亚硫酸盐转化未发生甲基化的胞嘧啶，通过脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐，发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化。将亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）做多重 PCR 扩增，PCR 反应中的引物、探针能区分甲基化和非甲基化序列，甲基化序列优先得到扩增，与甲基化 Septin9、SDC2、BCAT1 基因序列特异性结合的荧光素探针可以在 PCR 反应中专一地检测出甲基化序列。内参对照 ACTB

(β -actin) 基因用于评估检测中 DNA 量是否足够。

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干粉、PCR反应液、人类基因组DNA和Hela细胞基因组DNA。这些原料均是通过外购的方式获得。

其中引物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；PCR反应液由供应商化学合成获得；人类基因组DNA和Hela细胞基因组DNA由供应商提取纯化获得。

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. 企业参考品设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品以及检测限参考品，组成如下：

阳性参考品包括3种，由一定DNA浓度下，Septin9、SDC2、BCAT1三基因不同甲基化比例样本组成。

阴性参考品包括3种，其中两种为不同DNA浓度下，Septin9、

SDC2、BCAT1均无甲基化的参考品，一种为三基因均甲基化但甲基化比例低于检测限的阴性参考品。

精密度参考品包括2种，为一定DNA浓度下，Septin9、SDC2、BCAT1三基因均甲基化，但甲基化程度高低不同的精密度参考品。

检测限参考品包括1种，为一定DNA浓度下，Septin9、SDC2、BCAT1三基因甲基化略高于检测限水平的参考品。

(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中包括引物探针浓度的确定、PCR反应液的选择、阴/阳性质控品配方的确定等；对PCR过程中的退火温度进行研究；完成样本的用量以及样本保存时间的研究；对该产品三种适用机型宏石PCR分析系统SLAN-96P、Applied Biosystems 7500、Roche Lightcycler 480的反应程序及分析条件进行了研究。

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

本产品分析性能评估内容包括：准确性（阳性符合率、阴性符合率）、精密度、检测限、分析特异性的评估；核酸提取试

剂的性能评估；三种适用的 PCR 仪机型（宏石 PCR 分析系统 SLAN-96P、Applied Biosystems 7500, Roche Lightcycler 480）评估。

准确性研究分别使用三个批次的试剂盒对企业阴/阳性参考品及临床样本来源的结直肠癌阴/阳性样本池在三种适用机型上进行检测，检测结果为阳性符合率 100%、阴性符合率 100%。将三个基因的甲基化模板 DNA 混合成 DNA 不同浓度和不同甲基化水平的样本，使用试剂盒在三种适用机型上对其进行检测，准确性为 100%。将临床结直肠癌样本来源的 DNA，配制成不同甲基化比例的 Septin9、SDC2、BCAT1 单基因甲基化样本，在三种适用机型上对试剂盒检测的准确性进行研究，准确性为 100%。

精密度的研究使用了两种不同的样本。第一种样本是精密度参考品，使用三批次试剂盒分别在三种适用的仪器上进行检测。第二种样本是临床样本混合的阴性样本池和阳性样本池样品，对三批试剂盒的批次内/间、日内/日间（20 天）、操作者间及不同实验室间的精密度进行评价。研究结果显示 Septin9、SDC2、BCAT1 和 ACTB 基因 Ct 值的变异系数均小于 10%。

检测限研究，以阴性血浆样本为基质，对不同游离 DNA 浓度下含有不同比例甲基化 DNA 的血浆样本进行检测，确定血浆

样本的检测限，并在三种适用机型上进行验证。结果表明在血浆 DNA 浓度为 0.02ng/ μ L 时，试剂盒检测 P 值为阳性的检测限为 0.2% 三基因甲基化，0.5% 的 Septin9 基因甲基化、2% 的 SDC2 基因甲基化和 0.5% 的 BCAT1 基因甲基化。

特异性研究的扩增产物 SNP 分析显示人群中的 SNP 位点对检测结果无影响。交叉反应研究显示，检测试剂对于发生肠转移的其它原发性癌症（包括子宫内膜癌、宫颈癌）检出率较低，特异性均超过 80%，说明产品仅适用于原发性结直肠癌的检测。检测其它癌症包括胃癌、食管癌、胰腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌的特异性均超过 80%。检测自身免疫性疾病包括红斑狼疮和类风湿性关节炎的特异性均超过 90%。检测其它肠道良性疾病包括肠腺瘤、肠息肉和肠炎样本的特异性超过 85%。在有其它基因（SHOX2 和/或 RASSF1A）甲基化的肺癌样本中，检测的特异性超过 90%。

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：未甲基化 DNA（150ng/ml）、胆红素（0.20mg/ml）、血红蛋白（10mg/ml）、甘油三酯（12mg/ml）、蛋白（血清白蛋白，120mg/ml）、红细胞（0.4% v/v）、K2EDTA（20mg/ml）、胆固醇（5mg/ml）、尿酸（0.235mg/ml）和葡萄糖（10mg/ml），对检测结果无影响。

常见治疗药物，包括感冒药、消炎药、心脑血管疾病药、

糖尿病药、胃病药、维生素、高血压药、安定药、镇痛药等在最大使用剂量范围内，不影响试剂盒对样本检测的 Ct 值及 P 值判定。

对与试剂盒配套使用的血浆样本处理试剂（核酸提取试剂，京昌械备 20180004 号，北京艾克伦医疗科技有限公司）进行了性能评估，结果表明其与市场常用的核酸提取转化试剂（Qiagen 游离核酸提取和快速亚硫酸氢盐转化试剂盒）在 DNA 提取效率、重复性及抗干扰能力性能相当。试剂盒对于临床样本游离 DNA 的提取效率为 85.16%，提取转化均符合进一步 PCR 检测的要求。采用精密度研究中相同样本进行了配套使用的血浆样本处理试剂的提取精密度研究，结果表明在核酸提取过程中 DNA 提取量、P 值的变异系数小于 10%。

对该产品适用的三种仪器宏石 PCR 分析系统 SLAN-96P、Applied Biosystems 7500，Roche Lightcycler 480 进行了性能评估，结果显示在三种适用机型上的阴/阳性符合率、检测限、精密度均符合质量要求，可以作为该产品的适用机型。

（四）阳性判断值研究

申请人采用三基因拟合 P 值公式法确定阳性判断值。每个样本进行 3 次 PCR 平行测试，计算 Septin9、SDC2、BCAT1 和 ACTB 基因 3 个复孔平均 Ct 值，其中各个基因无扩增时，Ct

值定义为 45.0。ACTB 基因的 Ct 值 ≤ 35.0 时，样本检测结果有效。在确定样本检测结果有效的情况下，样本 P 值 ≥ 1.2 则判断样本为阳性，样本 P 值 < 1.2 则判断样本为阴性。

阳性判断值研究入组（训练集和验证集）有效样本数共计 513 例样本，包括正常样本 237 例、结直肠癌病人样本 146 例、其它干扰样本（包括肠腺瘤、肠息肉、肠炎、胃癌、食管癌和肝癌）130 例。样本数据进行多种方法统计分析，包括 1/3 次 PCR 反应 Ct 值、2/3 次 PCR 反应 Ct 值、3/3 次 PCR 反应 Ct 值、3 次 PCR 反应平均 Ct 值、单基因、两基因、三基因、三基因组合拟合公式等，比较不同分析方法的检测灵敏度、特异性、总符合率，最终确定使用三基因拟合 P 值公式法检测准确率最高。并使用测试集样本再次验证三基因拟合公式和其它阳性判断值方法，测试集研究入组有效例数 350 例样本，包括肠道正常样本 119 例、结直肠癌病人样本 106 例、其它干扰样本（包括肠腺瘤、肠息肉、肠炎、胃癌、食管癌和肝癌）125 例进行验证，结果表明三基因拟合 P 值公式法特异性为 94.67%，灵敏度为 90.57%，总符合率为 93.43%。

（五）稳定性研究

申请人对该产品的稳定性的研究包括长期稳定性、使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性和热稳定性）及样本稳定

性（包括全血、血浆及 BisDNA 的稳定性）。

长期稳定性：选择三批次试剂盒置于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，在储存后的第 0、3、6、9、12、13 个月进行检测，结果显示产品在生产后 13 个月的产品性能符合技术要求，试剂性能稳定。

确定产品有效期可达 12 个月。

使用稳定性：将三批试剂盒置于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 开瓶放置，分别于第 2 周、4 周和 6 周后，检测其外观、准确性、灵敏度、精密度等指标，稳定性结果 P 值及 CV 值均无显著差异，无显著变化趋势，其产品的主要性能均符合技术要求。将三批次试剂盒在规定的储存条件下，取出试剂盒反复冻融 6 次，检测每次冻融后的试剂盒的性能均符合技术要求。将三批试剂盒置于 37°C ，分别于 1 天、2 天、3 天后检测产品性能，均符合技术要求。

申请人对全血样本、血浆样本及 BisDNA 的样本稳定性进行了研究，研究结果表明使用 EDTA 抗凝管（BDVacutainer[®]，6mL，国械注进 20152222083）采集全血，建议选用 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 放置 4 小时以内的新鲜血样分离血浆后用于检测；使用康为游离 DNA 采血管（康为世纪，5mL，苏械注准 201922220059）采集全血，建议选用室温放置 4 天以内的血样分离血浆后用于检测；使用 Streck Cell free 采血管（DNA Cell-Free DNA BCT[®]BLOOD COLLECTION TUBE，货号 218962）采集全血，建议选用室温

放置 6 天以内的血样分离血浆后用于检测。分离后的血浆样本建议在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 30 天以内，在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 12 小时以内进行检测；BisDNA 保存期限为在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 4 天以内，在 $2 \sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存 16 小时以内进行 PCR 检测。血浆样本和 BisDNA 样本仅可冻融一次。

三、临床评价概述

本产品在上海市东方医院、山西省肿瘤医院和河南省肿瘤医院三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，结直肠癌和其他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。入组病例为结直肠癌疑似病例，样本类型为血浆。产品临床灵敏度和特异度评价共纳入临床病例 1321 例，其中结直肠癌病例 387 例（覆盖结直肠癌所有分期及病理分型），非结直肠癌的其他病例 934 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 84.75%（95%CI: 81.16%，88.35%），特异度为 94.22%（95%CI: 92.72%，95.72%）。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，临床试验还纳入 160 例结直肠癌疑似病例，采用试验体外诊断试剂与数字 PCR 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 Septin9 基因，阴性符合率为 96.06%，阳性符合率为 93.94%，总符合率为 95.63%；针对 SDC2 基因，阴性符合率为 98.50%，阳性符合率为 92.59%，总符合率为 97.50%；针对 BCAT1 基因，阴性符合率为 99.27%，阳性符合率为 91.30%，总符合率为 98.13%。上述结果显示两者之间具有良好的 consistency，本产品临床检测性能满足要求。

另外，采用试验体外诊断试剂对 40 例结直肠癌患者手术前后的样本进行连续检测，36 例样本术前检测结果为阳性，术后检测结果为阴性；4 例样本术前术后检测结果均为阴性，表明结直肠癌手术切除后血浆中甲基化水平降低。

综上所述，临床试验结果显示本产品的临床性能满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

本产品根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械产品的安全风险分析方式，对 Septin9/SDC2/BCAT1 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）进行风险分析。

（一）受益评估

结直肠癌是常见的恶性肿瘤之一，并且呈现逐年快速上升的势头。肠镜检查为结直肠癌诊断常用方法，该试剂盒适用于临床医生建议做肠镜检查的患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期

诊断或确诊的依据，仅作为辅助诊断供临床医生参考，提供给患者更多一种大肠癌辅助诊断方法的选择。本试剂盒对结直肠癌诊断的临床灵敏度为 84.75%（95%CI: 81.16%，88.35%），特异度为 94.22%（95%CI: 92.72%，95.72%）。

（二）风险评估

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，需要在说明书中提示以下信息：

1. 使用普通 EDTA 真空采血管采集后的血样应立即分离血浆，若不能立即分离血浆，应在 2~8℃ 保存，保存时间不超过 4 小时；使用游离 DNA 采血管采集后的血浆可以室温保存 4 天。不得冰冻血样。

2. 禁止使用离心机刹车（急停）功能，以防止破坏血细胞层。

3. 制备好的血浆样本可以在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 下保存不超过 30 天，可以在 2~8℃ 存放不超过 12 小时。血浆样本仅可冻融 1 次。

4. BisDNA 不立即使用，可在 2~8℃ 保存 16 小时，或在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 4 天。BisDNA 仅可冻融 1 次。

5. PCR 反应液和引物混合液使用完毕立即复冻。

6. 密封后的 PCR 管可在 2~8℃ 放置不超过 2 小时。
7. 只能用于体外诊断。
8. 该产品的有效性仅针对于血浆游离 DNA 采血管和 EDTA 抗凝采血管。对于其它血样的收集方式有效性没有做测试。
9. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应训练的试验者。
10. 由于结直肠癌检测依赖于样品中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样品收集过程、样品储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响，外周血的采集、血浆的制备和存储均应按照要求进行，否则将影响检测结果，导致假阴性的检测结果。
11. 由于血浆样本中游离 DNA 含量低、易降解，应严格按照【样本要求】的规定处理和保存样本，否则影响检测，造成假阴性结果。
12. 由于扩增的初始靶 DNA 含量极低，故扩增循环数较长。应尽量避免检测环境的污染，否则容易在扩增循环末期产生假阳性信号。
13. 本产品不适用于近期输血、进行过骨髓移植、怀孕患者的辅助诊断。

综合评价意见

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第 5 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。

2022 年 9 月 28 日

附件:产品说明书

Septin9/SDC2/BCAT1 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：Septin9/SDC2/BCAT1 基因甲基化检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】30 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人外周血血浆中 Septin9、SDC2、BCAT1 基因的甲基化。

病人外周血中甲基化的 Septin9、SDC2、BCAT1 基因可以通过 DNA 的特异扩增而被检测到。本试剂盒适用于临床医师建议做肠镜检查，但因病人依从性差或其它医学原因无法做肠镜检查患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，不能用于普通人群的肿瘤筛查。本产品仅作为原发性结直肠癌的辅助诊断供临床医师参考。

Septin9（胞裂蛋白 9）是高度保守的三磷酸鸟苷结合蛋白 septin 家族成员之一，广泛存在于人体细胞，具有重要的肿瘤抑制作用，其甲基化被证实与结直肠癌的发生密切相关。SDC2（多配体蛋白聚糖-2）在结肠间充质细胞中表达，参与细胞增殖、细胞迁移和细胞-基质相互作用，可以通过多种途径抑制肿瘤形成。BCAT1（支链氨基酸转移酶 1）为原癌基因 MYC 直接调控的下游靶基因之一，其表观遗传沉默可导致 Wnt 信号激活，诱导肿瘤发生。研究发现，结直肠癌患者血浆样本中 Septin9、SDC2 及 BCAT1 三基因启动子区域呈高度甲基化。甲基化可导致基因转录受到抑制，从而影响基因的正常表达，并使其抑癌功能丧失。

【检验原理】

提取血浆中的游离 DNA，然后用亚硫酸盐转化未发生甲基化的胞嘧啶，通过脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐，发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化。将亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）做多重 PCR 扩增，PCR 反应中的引物、探针能区分甲基化和非甲基化序列，甲基化序列优先得到扩增，与甲基化 Septin9、SDC2、BCAT1 基因序列特异性结合的荧光素探针可以在 PCR 反应中专一地检测出甲基化序列。内参对照 ACTB（ β -actin）基因用于评估检测中 DNA 量是否足够。

【主要组成成分】

试剂组分	主要成分	体积/数量
1.PCR 反应液	热启动 DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl ₂	0.6mlx2
2.引物混合液	引物、探针	0.24mlx1
3.阴性质控品	人类基因组 DNA、BSA 和 TE	4.2mlx1
4.阳性质控品	人类基因组 DNA、Hela 细胞基因组	4.2mlx1

DNA、BSA 和 TE

以下试剂和耗材是本试剂盒不包含，但对该实验必需的：

- 血浆游离 DNA 提取和亚硫酸盐转化试剂盒（使用试剂盒名称：核酸提取试剂；备案号：京昌械备 20180004 号；公司名称：北京艾克伦医疗科技有限公司）；
- 无水乙醇；
- 15 mL 聚丙烯离心管带有圆锥型底，无菌；
- 1.5 mL 离心管，圆底带有联体螺旋型的密封盖；
- 移液器，包括 1ml、200 μ L，20 μ L 及 10 μ L 规格；
- 移液器适配的吸头；
- 一次性移液器，可以非无菌包装，长度 15cm，体干直径 5mm，能吸取 5 mL 液体；
- 磁力架；
- 恒温震荡金属浴；
- 8 联排 PCR 管及管盖；
- 采血管：含 EDTA 抗凝剂的真空采血管（BD Vacutainer[®]，6mL，国械注进 20152222083），或游离 DNA 采血管（康为世纪，5mL，苏械注准 201922220059，或 Streck 游离 DNA 采血管（Streck Cell-Free DNA BCT[®]BLOOD COLLECTION TUBE，10mL，货号 218962）。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒于-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 存储，有效期为 12 个月。
2. 请勿使用过期的试剂，不同批次的试剂盒不能混用。避免反复冻融，最多可冻融 4 次。在第一次用后，所有的试剂在-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 可存储 6 周。生产日期及有效期至详见具体的产品标签。

【适用仪器】

宏石 PCR 分析系统 SLAN-96P、Applied Biosystems 7500、Roche Lightcycler 480。

【样本要求】

血样的收集和存储按以下执行：

1. 全血采集

采血量：5ml。

- 采血方法：采用 EDTA 抗凝管收集 5ml 静脉血（真空采血管，BD Vacutainer[®]，6mL，国械注进 20152222083，或游离 DNA 采血管，康为世纪，5mL，苏械注准 201922220059，Streck 游离 DNA 采血管，Streck Cell-Free DNA BCT[®]BLOOD COLLECTION TUBE，10mL，货号 218962）。

使用普通 EDTA 真空采血管采集后的血样应立即分离血浆，若不能立即分离血浆，应在 2~8 $^{\circ}$ C 保存，保存时间不超过 4 小时；使用游离 DNA 采血管采集后的血样可以室温保存 4 天。不得冰冻血样。

2. 血浆样本的制备和血浆保存

- 禁止使用离心机刹车（急停）功能，以防止破坏血细胞层。
- 离心装有全血的采血管 12 分钟，离心力 $1350 \pm 150\text{rcf}$ 。从离心机中取出采血管，用一个干净的一次性移液管把血浆转移到聚丙烯材质、圆锥底的 15ml 离心管中。
- 离心血浆 12 分钟，离心力 $1350 \pm 150\text{rcf}$ 。用新的一次性移液管将 2.0ml 血浆移入标记好的圆锥底的离心管中。
- 血浆样本可以 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下保存不超过 30 天；在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 存放不超过 12 小时。血浆样本仅可冻融 1 次。

3. 血浆游离 DNA 提取及亚硫酸盐转化

- 使用北京艾克伦医疗科技有限公司的核酸提取试剂（京昌械备 20180004 号），按照核酸提取试剂盒说明书提取、亚硫酸盐转化。BisDNA 样本可以 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 下保存不超过 4 天，可以在 $2 \sim 8^\circ\text{C}$ 存放不超过 16 小时。BisDNA 仅可冻融 1 次。

【检验方法】

1. 血浆游离 DNA 提取及亚硫酸盐转化

按照核酸提取试剂盒说明书提取、亚硫酸盐转化 2ml 血浆（2ml 质控品）游离 DNA，获得 35 μl 亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）。每个样本测试 3 个 PCR 复孔，亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）模板体积不能少于 32 μl 。

使用北京艾克伦医疗科技有限公司的核酸提取试剂（京昌械备 20180004 号），核酸提取及转化步骤如下：

● 试剂配制

洗液 A 使用前，须按瓶子标签所示，加入 40ml 无水乙醇进行稀释。

洗液 B 使用前，须按瓶子标签所示，加入 65ml 无水乙醇进行稀释。

核酸纯化磁珠初次使用时，必须剧烈摇晃 1~2 分钟让磁珠充分分散。

● 裂解

将 2.0ml 血浆样本分别转移到事先标记好的 15ml 离心管中；加入 3.0ml 裂解液 DL。盖紧离心管盖，涡旋混匀。把离心管置于轮状旋转混匀器上，室温中速（大约 10~20rpm）旋转 20 分钟。

● DNA 结合

将 100 μl 磁珠（新鲜悬浮）添加到 15ml 离心管中；盖紧离心管盖，颠倒混匀 5~6 次。把离心管置于轮状旋转混匀器上，室温中速（大约 10~20rpm）旋转 60 分钟。

● DNA 洗涤

将 15ml 离心管放置于磁力架上吸附 1~3 分钟。小心倒掉上清（注意不要倒掉磁珠，倒掉上清时保持 15ml 离心管放置于磁力架上）。若血浆样本中磁珠不能被磁力架有效分离，请将上述步骤的 15ml 离心管取下，加入 2.5ml 裂解吸附液颠倒混匀 5~6 次，重新放置在磁力架上进行磁珠分离。

如仍不能有效分离磁珠，可将 15ml 离心管置于 55℃（50~60℃）水浴，10 分钟，放置磁力架上再次磁珠分离。

加入 1.0ml 洗液 A，涡旋混匀确保磁珠彻底重悬。用一次性移液管将磁珠悬浮液移至标记好的 1.5ml 离心管中。再次用移液管吸取残留磁珠悬浮液，将其转移至 1.5ml 离心管中。

将 1.5ml 离心管放置于磁力架上吸附 1 分钟，小心吸弃所有液体，注意不要吸取磁珠。

短暂离心 1.5ml 离心管。放置 1.5ml 离心管在磁力架上重新吸附 1 分钟，用 10~100 μ l 移液器尽量除去残余液体。

将离心管放置室温晾干 10 分钟。

● 亚硫酸盐转化

一次向晾干的磁珠中加入 180 μ l 亚硫酸盐溶液，20 μ l 保护液，重悬磁珠。

将重悬磁珠转移到 PCR 管，将管置于 PCR 仪中，85℃ 恒温孵育 45 分钟，也可以使用其他恒温加热仪器，不要振荡。45 分钟后，立即将离心管取出。

● 结合

将上述含有磁珠的反应液转移到 1.5ml 离心管。在离心管中加入：600 μ l 裂解液 DL，300 μ l 无水乙醇（或 400 μ l 洗液 B）。涡旋混匀。

将离心管置于轮状旋转混匀器中，调整转速为 10~20rpm，孵育 15 分钟。

短暂离心，将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。

● 第一次洗涤

将离心管从磁力架上取下，加入 1000 μ l 洗液 A。涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心。将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。

● 第二次洗涤

将离心管从磁力架上取下，加入 1000 μ l 洗液 B，涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心，将含有磁珠的洗液转移到新的离心管中。将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。

● 第三次洗涤

将离心管从磁力架上取下，加入 1000 μ l 洗液 B，涡旋混匀重悬磁珠，短暂离心离心管。将离心管置于磁力架 1 分钟，小心吸弃所有液体。短暂离心，将离心管置于磁力架 1 分钟，用 10~100 μ l 移液器尽量除去残余液体。

● 晾干

打开离心管管盖，室温静置 10 分钟待乙醇挥发，不要震荡。

● 洗脱

将离心管移至无磁力架子上，加入 30~100 μ l 洗脱液。盖好离心管，涡旋混匀重悬磁珠。将离心管放入恒温振荡器中，室温，100 \pm 10rpm 震荡 10

分钟。短暂离心，将离心管置于磁力架 1 分钟。用 10~100 μ l 移液器将洗脱液转移新的离心管中。

DNA 用量研究表明试剂盒能够准确进行检测至少需要 10ngDNA，相应 ACTB Ct 值参考范围为 ≤ 35.0 。

2. PCR 检测

警告：在检验操作前，应先阅读相关 PCR 分析系统的使用说明书，熟悉仪器的操作流程。

2.1 PCR 预反应液的准备

- 根据反应样本量，融化 PCR 反应液、引物混合液。涡旋混匀 PCR 反应液 10-15 秒，短暂离心。
- 每个 PCR 反应需要 12.5 μ l PCR 反应液和 2.5 μ l 引物混合液。按比例将相应体积的 PCR 反应液和引物混合液加入到离心管中。涡旋混匀 PCR 预反应液，短暂离心，将管壁液滴离下来。

注意：PCR 反应液和引物混合液使用完毕立即复冻。

2.2 PCR 反应板准备

- 将 15 μ l PCR 预反应液加至选定好的 8 联排 PCR 管中。加入 10 μ l 的 BisDNA 至 PCR 管对应的孔中。
- 用管盖密封，1000 \pm 100rcf 离心 1 分钟，使混合液全部流入管底并且无气泡出现。密封后的 PCR 管可在 2~8 $^{\circ}$ C 放置不超过 2 小时。

2.3 宏石 PCR 分析系统 SLAN-96P 上机

2.3.2 PCR 反应管加载

PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，Septin9 选取 FAM 荧光通道，SDC2 选取 JOE 荧光通道，BCAT1 选取 Texas Red 荧光通道，ACTB 选取 Cy5 通道，如表 1 所示设置反应程序：

表 1：反应程序

步骤	描述	温度	时间	荧光信号收集	循环数
阶段 1	活化	98 $^{\circ}$ C	5 分钟		1
阶段 2	PCR 循环	95 $^{\circ}$ C	10 秒		45
		63 $^{\circ}$ C	5 秒		
		58 $^{\circ}$ C	30 秒	X	
阶段 3	降温	25 $^{\circ}$ C	10 秒		1

注：X 代表荧光收集阶段

2.3.2 分析条件设置

分析运行结果，将基线的起始点设为第“10”个循环，终点设为第“18”个循环，设置 Septin9、BCAT1 阈值 0.03，SDC2 阈值 0.05，ACTB 阈值 0.05（可视具体状况进行微调）。

2.4 Applied Biosystems 7500 PCR 仪上机

2.4.1 PCR 反应管加载

PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，Passive Reference 设置必须

为“none”，Septin9 选取 FAM 荧光通道，SDC2 选取 JOE 荧光通道，BCAT1 选取 Texas Red 荧光通道，ACTB 选取 Cy5 通道，如表 1 所示设置反应程序。

2.4.2 分析条件设置

分析运行结果，将基线的起始点设为第“10”个循环，终点设为第“18”个循环，设置 Septin9、SDC2 和 ACTB 阈值 6000，BCAT1 阈值 8000（可视具体状况进行微调）。

2.5 Roche Lightcycler 480 PCR 仪上机

2.5.1 PCR 反应管加载

点击设置，双击 Detection Formats 添加荧光通道：Septin9(465-510nm)、SDC2 (540-580nm)、BCAT1 (540-610nm)、ACTB (610-670nm)，如表 1 所示设置反应程序。

2.5.2 分析条件设置

分析条件设置，选择“Abs Quant/Fit Points”分析运行结果，将基线的起始点设为第“9”个循环，终点设为第“17”个循环；Noiseband 设为 Auto 模式；设置 Septin9 阈值为 0.7、SDC2 阈值为 0.55，BCAT1 阈值为 0.45，ACTB 阈值为 0.15（可视具体状况进行微调）。

2.6 P 值计算

将 PCR 数据文件以 txt 或 excel 格式输出，计算每个基因 3 个复孔平均 Ct 值导入到 P 值计算公式，计算输出 P 值及判断阴阳性。

【阳性判断值】

使用 Septin9/SDC2/BCAT1 基因甲基化检测试剂盒（PCR 荧光探针法）对临床研究样本进行 Septin9、SDC2、BCAT1 基因检测，使用本试剂盒 P 值计算公式分析 Ct 值获得样本风险值（P 值），所有样本 P 值均在 0 及以上。为了确定最佳临界点，再用统计学上的约登指数（真阳性率与假阳性率之差）来确定最合适的灵敏度和特异性所对应的 Cutoff 值。使用 ROC 法进行计算，Cutoff 值为 1.2 时准确性最优。

反应体系研究表明，产品能够进行准确测量需要提取得到游离 DNA 量对应的 ACTB Ct 值参考范围为 ≤ 35.0 。

【检验结果的解释】

1. 质控品性能指标：

阴性质控品：1 份阴性质控品，进行 3 次 PCR 平行测试，Septin9 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0 ，SDC2 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0 ，BCAT1 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0 ，内参 ACTB 扩增曲线正常且 Ct ≤ 35.0 ，P 值 < 1.2 。

阳性质控品：1 份阳性质控品，进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 Septin9 的平均 Ct ≤ 37.0 ，SDC2 的平均 Ct ≤ 37.0 ，BCAT1 的平均 Ct ≤ 37.0 ，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且 Ct ≤ 35.0 ，P 值 ≥ 1.2 。

2. 检验结果判读：

对每个样本进行 3 次 PCR 平行测试，计算 Septin9、SDC2 和 BCAT1 基因 3 个复孔平均 Ct 值，其中各个基因无扩增时，Ct 值定义为 45.0。

若质控品不满足以上性能指标，则试验失败，本次结果无效。

在质控品满足以上性能指标时，根据样本的检测结果判断阴阳性：

阳性结果：待测样本 ACTB 的 $Ct \leq 35.0$ ，样本 P 值 ≥ 1.2 则判断样本为阳性。

阴性结果：待测样本 ACTB 的 $Ct \leq 35.0$ ，样本 P 值 < 1.2 则判断样本为阴性。

无效结果：如果 ACTB 的 $Ct > 35.0$ ，说明本次结果无效。对于无效结果建议复查。

【检测方法的局限性】

1. 只能用于体外诊断。

2. 该产品的有效性仅针对于血浆游离 DNA 采血管和 EDTA 抗凝采血管。对于其它血样的收集方式有效性没有做测试。

3. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 实验训练的试验者。

4. 由于结直肠癌检测依赖于样品中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样品收集过程、样品储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响，外周血的采集、血浆的制备和存储均应按照要求进行，否则将影响检测结果，导致假阴性的检测结果。

5. 由于血浆样本中游离 DNA 含量低、易降解，应严格按照【样本要求】的规定处理和保存样本，否则影响检测，造成假阴性结果。

6. 由于扩增的初始靶 DNA 含量极低，故扩增循环数较长。应尽量避免检测环境的污染，否则容易在扩增循环末期产生假阳性信号。

7. 本产品不适用于近期输血、进行过骨髓移植、怀孕患者的辅助诊断。

【产品性能指标】

1. 产品的性能指标

1.1 物理检查

各管试剂外观完整，标记清楚，无破损。试剂融化后，溶液澄清透明，无沉淀，无悬浊物。说明书清楚完整，品名、批号和有效期清楚。

1.2 准确性

阳性符合率：检测 3 份阳性参考品（P1、P2、P3），每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 Septin9 平均 $Ct \leq 41.0$ ，SDC2 平均 $Ct \leq 42.0$ ，BCAT1 平均 $Ct \leq 41.0$ ，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 $Ct \leq 35.0$ ，P 值 ≥ 1.2 。

阴性符合率：检测 3 份阴性参考品（N1、N2、N3），每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 Septin9 的 3 次 PCR 无 Ct 或平均 $Ct > 41.0$ ，SDC2 的 3 次 PCR 无 Ct 或平均 $Ct > 42.0$ ，BCAT1 的 3 次 PCR 无 Ct 或平均 $Ct > 41.0$ ，内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 $Ct \leq 35.0$ ，P 值 < 1.2 。

在三种适用机型上用三个不同批次的试剂盒对阳性参考品和阴性参

考品进行检测，其准确性以上符合要求。在三种适用机型上使用三个不同批次的试剂盒对阳性样本池和阴性样本池进行检测，阳性符合率及阴性符合率均为 100%，准确性为 100%。在三种适用机型上使用三个不同批次的试剂盒对不同浓度及不同甲基化比例的模板 DNA 进行检测，检测准确性为 100%。

1.3 灵敏度

检测 3 份检测限参考品 (L)，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 Septin9 的平均 Ct<45.0，SDC2 的平均 Ct<45.0，BCAT1 的平均 Ct<45.0，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct≤35.0，P 值≥1.2。

在血浆 DNA 浓度为 0.02ng/μL 时，本产品检测 P 值为阳性的检测限为 0.2% 三基因甲基化，0.5% 的 Septin9 单基因甲基化、2% 的 SDC2 单基因甲基化和 0.5% 的 BCAT1 单基因甲基化。

1.4 批内精密度

检测精密度参考品 (J1、J2)，每种参考品进行重复 10 次测试，结果为 P 值≥1.2，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且 Ct≤35.0，计算所测得 Septin9、SDC2、BCAT1 和 ACTB 的 Ct 值的变异系数 (CV)，均不应高于 10%。

使用三个不同批次的试剂盒，在三种适用机型上分别检验阳性和阴性血浆样本，样本核酸提取转化后 DNA 量及 Septin9、SDC2、BCAT1 和 ACTB 基因扩增 Ct 值的变异系数均不高于 10%。三个不同实验室间 DNA 提取量和 Septin9、SDC2、BCAT1 和 ACTB 的 Ct 值的变异系数 (CV)，均不高于 10%。

1.5 稳定性

试剂盒置于 -20℃±5℃ 保存至有效期满 12 个月以后，检测结果应符合 1.2-1.4 的各项指标要求。

2. 其它干扰

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：未甲基化 DNA (150ng/ml)、胆红素 (0.20mg/ml)、血红蛋白 (10mg/ml)、甘油三酯 (12mg/ml)、蛋白 (血清白蛋白，120mg/ml)、红细胞 (0.4% v/v)、K₂EDTA (20mg/ml)、胆固醇 (5mg/ml)、尿酸 (0.235mg/ml) 和葡萄糖 (10mg/ml)，对检测结果无影响。

常见治疗药物，包括感冒药、消炎药、心脑血管疾病药、糖尿病药、胃病药、维生素、高血压药、安定药、镇痛药等在最大使用剂量范围内，对检测结果无影响。

3. 交叉反应

交叉反应验证表明本试剂盒检测干扰样本的综合特异性超过 85%。对于发生肠转移的其它原发癌症 (包括子宫内膜癌、宫颈癌) 检出率较低，特异性均超过 80%，说明产品仅适用于原发性结直肠癌的检测。检测其它癌症包括胃癌、食管癌、胰腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌的特异性均超过 80%。

检测自身免疫性疾病包括红斑狼疮和类风湿性关节炎的特异性均超过 90%。检测其它肠道良性疾病的特异性超过 85%。在有 SHOX2 和（或）RASSF1A 基因甲基化的肺癌样本中，检测的特异性超过 90%。

4. 临床试验结果

在 3 家临床试验机构完成临床试验，临床研究共入组有效样本 1321 例，以临床参考标准作为对比方法，试验结果显示：本产品的临床灵敏度为 84.75%，特异性为 94.22%。

【注意事项】

1. 实验室注意事项

- 1.1 所有试剂应用前需先 2~8℃ 解冻。
- 1.2 此项检测属分子诊断，检测场所应当满足卫生部临检中心对 PCR 临床实验室的要求。
- 1.3 在完成实验后，PCR 产物应当放入手套中，打结封口后丢弃，以免造成污染。

2. 微生物及感染状态

产物中不含有任何具有感染性的物质，不会感染人体或其它动物。待测血样应视为潜在的感染源，其操作应在具有生物安全标识和具有生物安全防护条件的微生物和生物医学实验室进行，以保护操作人员在工作时不会受到潜在感染源的影响。

【标识的解释】

	运输温度低于 8℃		参考使用说明书
	体外诊断医疗器械		试剂盒含量足够测试份数
	向上		易碎
	怕晒		怕雨
	阴性对照		阳性对照

【参考文献】

1. Catherine Lofton-Day, Fabian Model. et al, DNA-Methylation Biomarkers for Blood-Based Colorectal Cancer Screening, Clinical Chemistry, 2008;54(2):414-423.
2. TaeJeong Oh, Nayoung Kim, et al. Genome-Wide Identification and Validation of a Novel Methylation Biomarker, SDC2, for Blood-Based Detection of Colorectal Cancer. The Journal of Molecular Diagnostics, 2013; 15:498-507.
3. Susanne K. Pedersen, Rohan T. Baker, et al. A Two-Gene Blood Test for Methylated DNA Sensitive for Colorectal Cancer. Plos One, 2015; 10(4): e0125041.
4. Simon Ladefoged Rasmussen, Henrik Bygum Krarup, et al. Hypermethylated DNA, a circulating biomarker for colorectal cancer

detection. Plos One, 2017; 12(7): e0180809

5. Susan M. Mitchell, Thu Ho, et al. Evaluation of Methylation Biomarkers for Detection of Circulating Tumor DNA and Application to Colorectal Cancer. Gene, 2016; 7(12), 125

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京艾克伦医疗科技有限公司

住所：北京市昌平区科技园区白浮泉路 10 号 2 号楼北控科技大厦 3 层 302 室

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：北京市昌平区科技园区白浮泉路 10 号 2 号楼北控科技大厦 3 层 302 室、北京市昌平区超前路 37 号 1 幢 4 层 5-4-2-01

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】

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：

修改日期：

说明书编号及版本号：