

受理号：CSZ2200330

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、
VAV3 基因甲基化联合检测试剂盒（PCR-
荧光探针法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：上海鹄远健康科技有限公司

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.....	17

基本信息

一、 申请人名称

上海鸱远健康科技有限公司

二、 申请人住所

上海市浦东新区芙蓉花路500弄1号5层

三、 生产地址

上海市浦东新区芙蓉花路500弄20号3楼、4楼

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：

组分名称	主要成分	组分规格	24 测试/盒	48 测试/盒
通用稀释液	Tris-EDTA缓冲液	840 μL/支	3 支	6 支
预扩增引物池	引物	60 μL/支	1 支	2 支
预扩增 PCR 反应液	聚合酶、dNTPs	300 μL/支	1 支	2 支
荧光 PCR 引物池-1	引物、探针	60 μL/支	1 支	2 支
荧光 PCR 引物池-2	引物、探针	60 μL/支	1 支	2 支
荧光 PCR 引物池-3	引物、探针	60 μL/支	1 支	2 支
荧光 PCR 反应液	聚合酶、dNTPs	450 μL/支	2 支	4 支
阴性对照	BSA、非甲基化DNA	3 mL/支	4 支	4 支
阳性对照	BSA、非甲基化DNA、甲基化DNA	3 mL/支	4 支	4 支

(二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测人血浆样本中 **Septin9**、**BCAT1**、**IKZF1**、**BCAN**、**VAV3** 基因甲基化。

本产品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。

(三) 产品包装规格

24测试/盒、48 测试/盒。

(四) 产品检验原理

该产品利用亚硫酸氢盐处理可使甲基化的C碱基维持不变、非甲基的C碱基变成U的特性，结合PCR-荧光探针法进行检测。

产品以经亚硫酸氢盐转化处理后的DNA为起始，使用甲基化DNA特异性引物和荧光检测的探针，对甲基化DNA进行扩增和检测识别。在检测过程中选择靶位点和内参基因同时扩增的多重PCR受控体系，通过阳性对照和阴性对照参与样本平行提取、亚硫酸氢盐转化、PCR预扩增和荧光检测，可对检测过程进行质控。

该种方式所获得的数据为各个检测位点和内参的Ct值，依据阳性判断值进行定性判读，依据内参Ct值判读结果是否有效。

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和探针、PCR反应液、HCT116细胞系DNA和人源非甲基化基因组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；HCT116细胞系DNA和人源非甲基化基因组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括阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品以及检出限参考品。

企业参考品的主要原材料为细胞株、临床样本，包括不同基因不同浓度下相应位点甲基化阳性和阴性样本，这些样本的甲基化状态均经过数字PCR方法验证。

阳性参考品包括16种，覆盖试剂所有检测标志物，每个标志物均采用临床样本设置了不同核酸浓度和不同甲基化比例的参考品。

阴性参考品包括8种，包括了干扰疾病样本和其他肿瘤的相关基因甲基化的样本。覆盖试剂相关的交叉反应和干扰样本，包括良性疾病、其他肿瘤、含易产生交叉反应的其他基因甲基化样本。

精密度参考品包括3种，覆盖不同强度阳性样本以及阴性

样本。

检出限参考品包括5种，为一定甲基化比例和浓度的样本。覆盖试剂所有检测标志物，包括不同核酸浓度下的不同甲基化比例。

本试剂盒同时还设置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ACTB，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的确定、试剂用量的研究、阴/阳性对照的确定等；对PCR反应过程的退火温度及循环数研究；对样本用量以及样本保存时间进行了研究。通过功能性实验，最终确定了最佳反应体系。

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（阳性符合率、阴性符合率）、精密度、检出限、分析特异性的评估（交叉反应、干扰试验）、核酸提取试剂及亚硫酸氢盐转化试剂性能研究。

准确度研究分别使用三个批次的试剂盒对企业阴阳性参考品及结直肠癌、进展期腺瘤和其他对照人群的临床血浆样本进

行检测，并通过参比方法对甲基化状态进行确认。检测结果为阳性符合率100%、阴性符合率100%。

精密度研究使用临床阴性样本和阳性样本，使用三批试剂盒和不同操作者对样本进行了20天的检测。对产品的批次内、批次间、日内、日间、操作者间及不同实验间的精密度进行评价。研究结果显示样本的阳性符合率、阴性符合率均为100%。内参和靶点Ct值的变异系数（重复性、中间精密度和再现性CV）均小于5%。

检出限研究采用不同梯度甲基化比例、不同核酸浓度的样本进行检出限的建立研究，每份样本均分别进行20次重复检测，以95%检出率的最低核酸浓度和最低甲基化比例为检出限，并对95%检出的最低甲基化比例进行验证。结果显示，在血浆DNA浓度为0.25 ng/ μ L时，试剂盒可在95%水平检出0.5 %的Septin9、BCAT1、IKZF1甲基化，1 %的Septin9-2、BCAN、VAV3甲基化，六标志物联合检出限为0.2 %。

分析特异性研究包括交叉反应研究和干扰研究。

交叉反应研究中常见的其他甲基化基因对检测结果无影响；检测非类风湿性关节炎的特异性超过90%；检测消化道其他肿瘤（胃癌、肝癌、食管癌、胰腺癌）特异性大于等于80%；非消化道高发的其他肿瘤（肺癌、乳腺癌、甲状腺癌等）检测特

异性大于等于80%。

干扰研究结果显示，试剂盒检测结果不受浓度低于以下水平物质的干扰：胆红素（0.2 mg/mL）、血红蛋白（10 mg/mL）、甘油三酯（12 mg/mL）、血清白蛋白（40 mg/mL）、胆固醇（5 mg/mL）、尿酸（0.235 mg/mL）、葡萄糖（10 mg/mL）和K₂EDTA（20 mg/mL）；常用药物包括：布洛芬（1.07 mg/mL）、对乙酰氨基酚（1 mg/mL）、阿莫西林（2 mg/mL）、头孢（0.27 mg/mL）、盐酸左氧氟沙星（1.08 mg/mL）、甲硝唑（1.8 mg/mL）、盐酸二甲双胍（1 mg/mL）、阿托伐他汀钙片（0.04 mg/mL）、卡托普利（0.09 mg/mL）、氢氯噻嗪（0.05 mg/mL）、奥美拉唑（0.06 mg/mL）、盐酸小檗碱（4.615 mg/mL）、多潘立酮（0.048 mg/mL）、维生素C（0.15 mg/mL）、奥沙利铂（0.195 mg/mL）。

申请人对核酸提取试剂盒、亚硫酸氢盐转化试剂盒进行研究，与商业化试剂盒进行对比，并根据与产品的组合性能研究结果，确定推荐的核酸提取试剂和亚硫酸氢盐转化试剂符合检测要求。

（四）阳性判断值研究

本研究分为阳性判断值建立和验证两部分，共采用545例患者，包括结直肠癌、肠道炎症、息肉、腺瘤和肠镜未见异常

人群，所有人群均有临床诊断标准以及参比方法的检测结果。

将样本分为训练集和验证集，并建立逻辑回归模型，通过赋予各个标志物不同的加权系数，计算得到联合检测的总数值（P值）。联合检测的P值采用ROC曲线和约登指数确定试剂盒的阳性判断值为6.0。再通过验证集进行独立样本验证，性能数据结果与训练集一致。

当 $P \geq 6.0$ 时，样本检测结果为阳性；当 $P < 6.0$ 时，样本检测结果为阴性。

（五）稳定性研究

申请人对该产品的实时稳定性、使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性）及样本稳定性（包括全血、血浆、提取后DNA及转化后DNA稳定性）进行了研究。

实时稳定性：采用三批次试剂储存于 $-25 \sim -15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ，分别在第0、3、6个月和超效期，进行试剂盒全性能检测包括外观检查、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、检出限和精密度的检测，确定试剂在 $-25 \sim -15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存6个月。

使用稳定性：采用一批次试剂，模拟实际使用情况，在0、3、6个月和超效期，累积进行5次模拟使用。各时间点检测结果均符合要求。故试剂盒使用后放置 $-25 \sim -15 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件保存，可稳定至效期末。

冻融稳定性：采用一批次试剂，分别冻融1、2、4、5次后进行性能检验，确定试剂在首次开封后，冻融总共不超过4次使用。

样本稳定性：申请人针对全血样本、血浆样本、血浆游离DNA以及亚硫酸氢盐处理后的DNA均进行样本稳定性研究。结果显示：EDTA抗凝采血管采集的全血样本在常温（10~30℃）条件下保存不超过6小时，或在2~8℃保存不超过24小时，不得冷冻全血；游离DNA采血管采集的全血样本常温（10~30℃）保存96小时，不得冷藏或冷冻全血。分离后的血浆样本在-25~-15℃条件下保存不超过4周，于-70℃以下保存不超过6个月。血浆游离DNA可于-25~-15℃保存不超过6个月，反复冻融不超过2次。亚硫酸氢盐处理后的DNA立即检测或在2~8℃保存不超过24小时。

三、临床评价概述

本产品在上海交通大学附属肿瘤医院、徐州医科大学附属医院、浙江省人民医院、山东第一医科大学附属肿瘤医院、西安高新医院、西安大兴医院和山西省人民医院七家临床研究机构进行临床试验，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采用病理诊断

等综合诊断确诊。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1965例，其中结直肠癌病例432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1533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87.3%（95%CI: 84.1%~90.4%），进展期腺瘤的灵敏度为41.2%（95%CI: 30.7%~51.6%），特异度91.1%（95%CI: 89.6%~92.5%）。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254例结直肠癌疑似病例，采用试验体外诊断试剂与NGS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基因的Septin9-1位点，阳性符合率为95.9%（95%CI: 88.6%~98.6%），阴性符合率为100%（95%CI: 97.9%~100%），总符合率为98.8%（95%CI: 96.6%~99.6%）；针对BACT1基因，阳性符合率为92.0%（95%CI: 83.6%~96.3%），阴性符合率为96.7%（95%CI: 92.9%~98.5%），总符合率为95.3%（95%CI: 91.9%~97.3%）；针对IKZF1基因，阳性符合率为100%（95%CI: 93.7%~100%），阴性符合率为99.5%（95%CI: 97.2%~99.9%），总符合率为99.6%（95%CI: 97.8%~99.9%）；针

对BCAN基因，阳性符合率为94.4%（95%CI：84.9%~98.1%），阴性符合率为96.0%（95%CI：92.3%~97.9%），总符合率为95.7%（95%CI：92.4%~97.6%）；针对VAV3基因，阳性符合率为95.3%（95%CI：87.1%~98.4%），阴性符合率为100%（95%CI：98.0%~100%），总符合率为98.8%（95%CI：96.6%~99.6%）；针对Septin9基因的Septin9-2位点，阳性符合率为93.6%（95%CI：84.6%~97.5%），阴性符合率为96.4%（95%CI：92.7%~98.2%），总符合率为95.7%（95%CI：92.4%~97.6%）；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。

另外，采用试验体外诊断试剂对72例结直肠癌患者手术前后的样本进行连续检测，术前的阳性检出率为87.5%，术后的阳性检出率为19.1%；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

根据YY/T 0316-2016《医疗器械 风险管理对医疗器械的应用》对人Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、VAV3基因甲基化联合检测试剂盒（PCR-荧光探针法）进行产品受益风险判定。

（一）受益评估

结直肠癌（Colorectal cancer, CRC）是常见的消化道恶性肿瘤，据国家癌症中心发布最新统计数据显示，在我国结直肠癌的发病率和死亡率均位居癌症中的前五位。早期结直肠癌常发病隐匿，可无明显的临床症状。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。

其临床应用的主要受益在于：该产品为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提供一种体外无创的结直肠癌辅助诊断方法的选择。本产品临床灵敏度为87.3%（95%CI: 84.1% ~ 90.4%），特异度91.1%（95%CI: 89.6% ~ 92.5%）。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。

（二）风险评估

根据申请人提供的申报资料，通过对该产品从生产原材料、配制、检测、标识、包装、运输、储存、使用方法及安全注意事项、保存和使用处理等全过程危害判定、风险评估、预防化解，从产品技术要求和说明书以及企业规章制度对产品质量

量的全过程控制和风险防控措施，已将产品的风险系统降低至验收准则规定的可接受范围内，同时采取降低风险的措施后未引入新的风险。在目前的认知水平上，认为该产品上市带来的受益大于风险。

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.与生物学危害有关的安全风险，例如使用过的试剂废液随意排放或抛弃，未按照废弃物分类并按医疗垃圾处理。

2.与使用有关的风险，例如使用不配套的仪器或者不按说明书操作，操作者未经培训就操作。

3.与生产过程相关的风险，例如说明书印刷错误、生产设备维护不当。

4.与运输和储存有关的风险，例如在不正确的储存温度下储存试剂盒。

5.与预期用途有关的风险。尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在说明书中提示以下信息：

（1）预期用途

本产品用于体外定性检测人血浆样本中Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、VAV3基因甲基化。

本产品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。

(2) 警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检查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，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5月8日

附件：产品说明书

人Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、VAV3基因甲基化联合检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

说明书

【产品名称】

通用名称：人Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、VAV3基因甲基化联合检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 测试/盒、48 测试/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人血浆样本中Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、VAV3基因甲基化。

本产品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蛋白能够调节细胞生长，防止细胞分裂过快或以不受控制的方式进行分裂增殖，具有相应的抑癌作用。BCAT1在催化支链氨基酸降解的第一步和促进谷氨酸产生中起重要作用，其甲基化可导致Wnt信号激活，导致肿瘤发生。IKZF1作为转录调控因子，被证实可调节多个肿瘤相关信号通路。BCAN作为一种多糖结合蛋白，广泛参与多种细胞活动调节。VAV3是Rho家族GTPase的鸟嘌呤核苷酸转移因子，参与MAPK、PI3K-Akt、NF- κ B等信号转导通路的调控，与肿瘤的发生密切相关。研究发现DNA甲基化可用于临床上结直肠癌的辅助诊断，其中Septin9、BCAT1、IKZF1、VAV3、BCAN甲基化与结直肠癌的相关性均有报导^[1-4]。Septin9、BCAT1、IKZF1、BCAN、VAV3进行5基因甲基化联合检测结直肠癌已有多篇研究进行报导^[4-5]。已知某些疾病患者如消化道炎症、非类风湿关节炎、非肠道癌症以及孕妇中观察到上述基因甲基化阳性结果^[6-8]。

【检验原理】

本产品利用亚硫酸氢盐处理可使甲基化的C碱基维持不变、非甲基的C碱基变成U的特性，结合PCR-荧光探针法进行检测。

产品以经亚硫酸氢盐转化处理后的DNA为起始，使用甲基化DNA特异性引物和荧光检测的探针，对甲基化DNA进行扩增和检测识别。在检测过程中选择靶位点和内参基因同时扩增的多重PCR受控体系，通过阳性对照和阴性对照参与样本平行提取、亚硫酸氢

盐转化、PCR预扩增和荧光检测，可对检测过程进行质控。

该种方式所获得的数据为各个检测位点和内参的Ct值，依据阳性判断值进行定性判读，依据内参Ct值判读结果是否有效。

【主要组成成分】

1. 试剂盒中包含的试剂组分

表 1 试剂盒组成、规格及主要成分

序号	组分名称	组分规格	24 测试/盒	48 测试/盒	试剂组分
1	通用稀释液	840 μL/支	3 支	6 支	Tris-EDTA缓冲液
2	预扩增引物池	60 μL/支	1 支	2 支	引物混合物
3	预扩增 PCR 反应液	300 μL/支	1 支	2 支	聚合酶、dNTPs
4	荧光 PCR 引物池-1	60 μL/支	1 支	2 支	引物、探针混合液
5	荧光 PCR 引物池-2	60 μL/支	1 支	2 支	引物、探针混合液
6	荧光 PCR 引物池-3	60 μL/支	1 支	2 支	引物、探针混合液
7	荧光 PCR 反应液	450 μL/支	2 支	4 支	聚合酶、dNTPs
8	阴性对照	3 mL/支	4 支	4 支	BSA、非甲基化DNA
9	阳性对照	3 mL/支	4 支	4 支	BSA、非甲基化DNA、甲基化DNA

2. 产品不包含，需配合使用的试剂和仪器

配合使用的试剂如下：

产品名称	生产厂家	备案号
核酸提取试剂	上海鸚远医疗科技有限公司	沪浦械备20180121号
甲基化检测样本前处理试剂盒	上海鸚远医疗科技有限公司	沪浦械备20200193号

以下试剂、仪器和耗材是本试剂盒不包含，但对试验是必需的：

- 1) 高灵敏双链 DNA 荧光定量分析试剂 Qubit dsDNA HS Assay Kit (生产商: Thermo Fisher Scientific Inc.)
- 2) 无水乙醇
- 3) 异丙醇
- 4) 采血管: 使用 EDTA 抗凝采血管进行采血, 如 BD K2EDTA采血管; 或游离DNA

采血管：如河北鑫乐医疗器械，冀械注准20192220083

5) 冷冻低速离心机（温度覆盖2~8℃，10 mL转子，可达1600 g）

6) 冷冻高速离心机（温度覆盖2~8℃，2 mL转子，可达16000 g）

7) 荧光计（生产商：Thermo Fisher Scientific Inc.）

8) 涡旋混匀仪

9) 移液器及其适配吸头

10) PCR管或板（适配ABI 7500）

11) 适配离心机的1.5 mL或2 mL离心管

【储存条件及有效期】

试剂盒于-20±5℃保存，有效期6个月。

试剂盒使用后放置-20±5℃保存，可稳定至效期末，冻融次数不超过4次。

产品生产日期及有效日期见标签。

【适用仪器】

荧光定量PCR仪（Applied Biosystem 7500）

【样本要求】

1. 检测样本类型：血浆

2. 全血样本采集及保存

1) 采血量

静脉采血不少于8 mL，采血管为EDTA抗凝采血管或游离DNA采血管。

2) 保存方式

EDTA抗凝采血管采集后的全血样本应立即进行处理。若不能立即处理，应在常温（10~30℃）下保存不超过6小时，或在2~8℃保存不超过24小时，不得冻存全血。

游离DNA采血管应在常温（10~30℃）保存不超过96小时，不得冷藏或冷冻全血。

3. 血浆样本的制备及保存

1) 血浆制备：采用两次离心法进行血浆分离。第一次离心：采血管于2~8℃，1600×g离心15分钟，离心结束后转移上层血浆至离心管中，注意不要碰到白膜层。第二次离心：装有上层血浆的离心管于2~8℃，16000×g离心10分钟，转移上层血浆至冻存管中，备用。血浆分离过程中禁止使用离心机刹车（急停）功能，以防止破坏血细胞层。

2) 保存条件：在-20±5℃保存不超过4周，在-70℃以下保存不超过6个月。

【检验方法】

1. 血浆游离DNA的提取

将血浆样本及试剂盒自带的阴性对照和阳性对照取出，放置于常温下至完全融化。

上下颠倒混匀，备用。

取3 mL血浆样本、阴性对照、阳性对照参照核酸提取试剂说明书进行DNA提取，洗脱体积为50 μL ，得到核酸DNA。利用Qubit荧光计及配套的定量试剂对样本进行浓度定量，血浆样本提取的DNA浓度应不低于0.3 $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，阳性对照和阴性对照提取的DNA浓度应均不低于0.5 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 。

提取的DNA可以立即用于检测；如果不能立即检测，可在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存不超过6个月，反复冻融不超过2次。

2. DNA亚硫酸氢盐转化

推荐DNA投入量20 ng ，如不足20 ng ，至少需投入10 ng 。DNA投入体积20~40 μL ，若不足20 μL ，利用通用稀释液或提取时的洗脱液补足至20 μL 。参照甲基化检测样本前处理试剂盒说明书对核酸DNA进行亚硫酸氢盐转化，最终转化后的DNA，用15 μL 洗脱液进行洗脱。

注意：若转化后的DNA不立即使用，可在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存不超过24小时。

3. 靶点预扩增

从试剂盒中取出预扩增PCR反应液和预扩增引物池，室温融化后涡旋混匀10~15秒，短暂离心，备用。根据下表进行预扩增PCR混合液的配制：

组分	样本数（包含阴阳性对照）	取样量	备注
预扩增 PCR 反应液	N	$(N+1) \times 12.5 \mu\text{L}$	N=血浆样本数+2（阳性对照、阴性对照）
预扩增引物池	N	$(N+1) \times 2.5 \mu\text{L}$	

涡旋混匀10~15秒，短暂离心，得到预扩增PCR混合液。

在PCR反应管中每管分别分装15 μL 上述预扩增PCR混合液，转移亚硫酸氢盐处理后DNA至PCR管中，盖好管盖，涡旋混匀10~15秒，短暂离心。

将PCR反应管置于热循环PCR仪上，立即进行PCR扩增反应。反应程序如下：

步骤	循环数	温度	时间
阶段 1	1	95°C	3 min
阶段 2	15	95°C	30 sec
		56°C	1 min
阶段 3	1	4°C	Hold

在PCR过程中，可进行步骤4中荧光PCR反应混合液试剂准备工作。

靶点预扩增的PCR产物，推荐立即进行荧光PCR检测，若不能立即检测可在-20±5℃

以下保存不超过3天，反复冻融不超过2次。

4. 荧光PCR反应

1) 荧光PCR反应液配制

从试剂盒中取出荧光PCR反应液、荧光PCR引物池-1、荧光PCR引物池-2和荧光PCR引物池-3，室温融化后涡旋混匀10~15秒，短暂离心，备用。根据下表进行荧光反应混合液1，2，3的配制：

荧光PCR反应混合液名称	组分	样本数（包含阴性对照）	取样量	备注
荧光PCR反应混合液 1	荧光PCR反应液	N	(N+1) ×12.5 μL	N=血浆样本数+2 (阳性对照、阴性对照)
	荧光PCR引物池-1		(N+1) ×2.5 μL	
荧光PCR反应混合液 2	荧光PCR反应液	N	(N+1) ×12.5 μL	
	荧光PCR引物池-2		(N+1) ×2.5 μL	
荧光PCR反应混合液 3	荧光PCR反应液	N	(N+1) ×12.5 μL	
	荧光PCR引物池-3		(N+1) ×2.5 μL	

涡旋混匀10~15秒，短暂离心后，将荧光PCR反应混合液1，2，3分别分装15 μL至荧光PCR 8 连管中。

2) 预扩增产物稀释

在生物安全柜中，取一新PCR管加入45 μL通用稀释液，然后再将步骤3中的预扩增产物取5 μL加入，盖上管盖，涡旋混匀并短暂离心，得到预扩增稀释产物。

3) 加样

上述已稀释预扩增产物分别用三种已分装好的荧光PCR反应混合液进行检测，每个反应孔加入10 μL预扩增稀释产物，盖上管盖，涡旋混匀并短暂离心。

4) 仪器设置及运行

将荧光PCR管放置于荧光PCR仪上，立即进行PCR扩增反应，反应程序如下：

步骤	循环数	温度	时间	备注
阶段 1	1	95℃	5 min	
阶段 2	40	95℃	15 sec	
		56℃	40 sec	信号收集

荧光PCR混合液相对应的检测靶点以及相应的荧光报告基团设置，详见下表：

荧光 PCR 反应混合液	检测（靶点）	报告基团
1	Septin9	FAM
	ACTB-T	TAMRA
2	IKZF1	FAM
	BCAT1	VIC
	ACTB	TAMRA
3	Septin9-2	FAM
	BCAN	VIC
	VAV3	TAMRA
	ACTB-C	CY5

5. 结果计算

1) ΔCt 计算

靶点 $\Delta Ct = (\text{靶点Ct值} - \text{内参Ct值}) / (40 - \text{内参Ct值})$ ，未产生扩增信号的靶点Ct值定义为40，内参Ct值采用各靶点相应检测孔内参。

2) Logit值计算

$$\text{Logit} = 0.461 - 0.112 * \text{Septin9 } \Delta Ct - 0.143 * \text{BCAT1 } \Delta Ct - 0.123 * \text{IKZF1 } \Delta Ct - 0.150 * \text{Septin9-2 } \Delta Ct - 0.065 * \text{BCAN } \Delta Ct - 0.092 * \text{VAV3 } \Delta Ct$$

3) P值计算

$$P = 658.76 / (1 + e^{-\text{Logit}}) - 292.62$$

【阳性判断值】

本产品根据各个基因的 ΔCt 值，计算P值，P值的阳性判断值为6.0。

为建立试剂盒的阳性判断值，对545例临床样本进行检测，样本分为训练集和验证集。包括结肠直肠癌患者、腺瘤患者、肠道息肉、炎症患者和肠镜未发现异常人群。利用逻辑回归模型对训练集各个基因的 ΔCt 值进行回归拟合分析后得到P值，通过ROC法进行计算，根据P值约登指数，确定阳性判断值。

【检测结果的解释】

1. 试剂盒有效性判定

阳性对照和阴性对照需要满足下述要求，否则该次实验无效。

荧光PCR混合液	Target (靶点)	报告基因	靶点类型	阳性对照	阴性对照
荧光PCR混合液-1	Septin9	FAM	检测靶点	≤31.5	无 Ct
	ACTB-T	TAMRA	内参基因	≤23	≤23
荧光PCR混合液-2	IKZF1	FAM	检测靶点	≤35	无 Ct
	BCAT1	VIC	检测靶点	≤35	无 Ct
	ACTB	TAMRA	内参基因	≤23	≤23
荧光PCR混合液-3	Septin9-2	FAM	检测靶点	≤35	无 Ct
	BCAN	VIC	检测靶点	≤30	无 Ct
	VAV3	TAMRA	检测靶点	≤35	无 Ct
	ACTB-C	CY5	内参基因	≤23	≤23

样本的结果有效性判定

三个孔的内参基因Ct值均≤23，样本结果有效，否则该样本结果无效，建议复测。

2. 样本结果判读

在满足当次实验结果和样本结果有效前提下，无扩增信号的标志物Ct值被设定为40，根据计算公式得到样本P值。

阳性结果：当 $P \geq 6.0$ 时，样本检测结果为阳性。

阴性结果：当 $P < 6.0$ 时，样本检测结果为阴性。

【检验方法的局限性】

1. 本检测结果不能作为确诊结直肠癌的证据，仅供临床参考。其他癌症会有一定检出。检测呈阳性的患者还需接受肠镜进一步检查以便确诊。临床医生应结合患者的其他检查结果对检测结果进行综合判断。

2. 检测结果为阴性时，不能完全排除结直肠癌可能，样本中肿瘤相关DNA过少，或者样本处理不当都有可能造成假阴性的结果。

3. 血浆样本游离DNA含量低，应严格按照样本要求进行处理和保存，不当的样本处理过程可能影响检测结果。

4. 本试剂盒检测经过两轮扩增，不当的实验操作和环境可能影响检测结果。

【产品性能指标】

1. 外观

试剂盒组分及信息齐全，外观清洁、无泄漏、无破损。各组分标签信息清晰、无误、无缺失。

2. 准确度

2.1 阳性符合率

检测16份阳性参考品（P1~P16），检测结果应为阳性。

2.2 阴性符合率

检测8份阴性参考品（N1~N8），检测结果应为阴性。

2.3 临床血浆样本进行准确度研究，结果表明：结直肠癌灵敏度为85.0%，对照人群特异度为93.3%。各标志物试剂盒甲基化检测结果与测序结果一致性均为100%。

3. 检出限

3.1 检测5份检出限参考品（L1~L5）。

A) 样本检测结果应为阳性。

B) L1、L2和L4对应靶点的Ct值应满足以下要求：Septin9靶点Ct值 ≤ 31.5 ，BCAT1、IKZF1、Septin9-2、VAV3靶点Ct值 ≤ 35 ，BCAN靶点Ct值 ≤ 30 。

3.2 使用临床样本进行检出限研究，结果表明：在血浆DNA浓度为0.25 ng/ μ L时，试剂盒可在95%及以上水平检出0.5%的Septin9甲基化、0.5%的BCAT1甲基化、0.5%的IKZF1甲基化、1%的Septin9-2甲基化、1%的BCAN甲基化、1%的VAV3甲基化，联合检出限为0.2%六标志物甲基化。

4. 精密度

4.1 检测3份企业精密度参考品。检测企业精密度参考品J1、J2，重复检测10次，检测结果均为阳性，靶点及内参Ct值的变异系数CV $\leq 5\%$ ；检测企业精密度参考品J3，重复10次，检测结果均为阴性，内参Ct值的变异系数CV $\leq 5\%$ 。

4.2 使用试剂盒检测不同浓度和不同甲基化比例的中强阳性、弱阳性以及阴性临床样本分别评价批内、批间及检测日内、日间（连续20天）、不同操作者间精密度，结果显示大于等于检出限甲基化比例位点和所有内参位点Ct值的重复性CV，中间精密度CV和再现性CV均 $\leq 5\%$ ，检测结果阳性符合率100%，阴性符合率100%。

5. 其他干扰及交叉反应

5.1 本试剂盒检测结果不受浓度低于以下水平物质的干扰：

血液中内源干扰物质：胆红素（0.2 mg/mL）、血红蛋白（10 mg/mL）、甘油三酯（12 mg/mL）、血清白蛋白（40 mg/mL）、胆固醇（5 mg/mL）、尿酸（0.235 mg/mL）和葡萄糖（10 mg/mL）；消化系统疾病常用药物：布洛芬（1.07 mg/mL）、对乙酰氨基酚（1 mg/mL）、阿莫西林（2 mg/mL）、头孢（0.27 mg/mL）、盐酸左氧氟沙星（1.08 mg/mL）、甲硝唑（1.8 mg/mL）、盐酸二甲双胍（1 mg/mL）、阿托伐他汀钙片（0.04 mg/mL）、卡托普利（0.09 mg/mL）、氢氯噻嗪（0.05 mg/mL）、奥美拉唑（0.06

mg/mL)、盐酸小檗碱(4.615 mg/mL)、多潘立酮(0.048 mg/mL)、维生素 C(0.15 mg/mL)、奥沙利铂(0.195 mg/mL); 血浆抗凝剂: K2EDTA(20 mg/mL)。

5.2 常见的其他消化道肿瘤甲基化基因(BMP3/NDRG4/SDC2/SHOX2)对检测结果无干扰。

5.3 检测非类风湿性关节炎的特异性超过90%。

5.4 试剂盒检测消化道其他肿瘤胃癌、肝癌、食管癌、胰腺癌特异性大于等于80%，非消化道高发的其他肿瘤肺癌、乳腺癌、甲状腺癌、宫颈癌、肾癌、前列腺癌检测特异性大于等于80%。

6. 临床性能: 临床研究共入组有效样本1965例, 与临床参考标准比对, 结果显示本产品的临床灵敏度为87.3%, 特异度为91.1%。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 本检测的实验操作人员应接受过相应培训。
3. 不合理的血液采集、血浆分离、血浆保存和运输、核酸提取、亚硫酸氢盐转化处理可能导致假阳性或者假阴性结果。
4. 预扩增产物避免长时间开盖, 用于预扩增产物稀释和转移的移液枪头, 在使用后立即浸泡在10%次氯酸溶液中。实验结束后, 立即用10%次氯酸或75%酒精或紫外灯处理工作台与移液器, 尽量避免检测环境的污染。
5. 实验时, 应注意外源DNA的污染, 加完样本DNA且盖好管盖后, 再进行阳性对照DNA的开盖加样。
6. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀, 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。
7. 对照品、样本以及实验中接触过对照品和样本的废弃物品应进行无害化处理后方可丢弃。
8. 所有化学药品都具有潜在的危险性。只有经过培训合格的人员才能使用本试剂盒。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。
9. 使用后的试剂样本等废弃物应按照国家相关规定妥善处理。

【标识的解释】

 体外诊断医疗器械

【参考文献】

1. Song L, Li Y, Jia J, Zhou G, Wang J, Kang Q, et al. (2016) Algorithm

Optimization in Methylation Detection with Multiple RT-qPCR. PLoS ONE 11(11): e0163333.

2. Pedersen, S.K., Symonds, E.L., Baker, R.T. *et al.* Evaluation of an assay for methylated *BCAT1* and *IKZF1* in plasma for detection of colorectal neoplasia. *BMC Cancer* **15**, 654 (2015)

3. BEGGS A D, JAMES J, CALDWELL G, *et al.* Discovery and Validation of Methylation Biomarkers for Ulcerative Colitis Associated Neoplasia [J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(7): 1503-9.

4. Cai G, Cai M, Feng Z, *et al.* A Multilocus Blood-Based Assay Targeting Circulating Tumor DNA Methylation Enables Early Detection and Early Relapse Prediction of Colorectal Cancer. *Gastroenterology*. 2021;161(6):2053-2056.e2.

5. Mo S, Ye L, Wang D, *et al.* Early Detection of Molecular Residual Disease and Risk Stratification for Stage I to III Colorectal Cancer via Circulating Tumor DNA Methylation. *JAMA Oncol*. 2023;e230425.

6. Warren J. D., Xiong W., Bunker A. M., *et al.* Septin9 methylated DNA is a sensitive and specific blood test for colorectal cancer. *BMC Medicine*. 2011;9(1):p. 133.

7. Grützmann R., Molnar B., Pilarsky C., *et al.* Sensitive detection of colorectal cancer in peripheral blood by septin9 DNA methylation assay. *PLoS One*. 2008;3(11, article e3759).

8. Powrozek T., Krawczyk P., Kucharczyk T., Milanowski J. Septin9 promoter region methylation in free circulating DNA-potential role in noninvasive diagnosis of lung cancer: preliminary report. *Medical Oncology*. 2014;31(4):p. 917.

【基本信息】

注册人：上海鸚远健康科技有限公司

住所：上海市浦东新区芙蓉花路500弄1号5层

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

受托企业名称：上海鸚远医疗科技有限公司

住所/生产地址：上海市浦东新区芙蓉花路500弄20号3楼、4楼

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】