受理号：CSZ2100018

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合
检测试剂盒(荧光 PCR 法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：上海锐翌生物科技有限公司

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.....	12
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

上海锐翌生物科技有限公司

二、申请人住所

上海市闵行区新骏环路 138 号 6 幢 202-3、302 室

三、生产地址

上海市闵行区新骏环路 138 号 6 幢 202-3、302 室；上海市闵行区新骏环路 245 号 E 幢 6 层 616 室

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

	功能	序号	组分名称	规格和装量	主要成分
人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒	扩增反应试剂	1	qPCR 反应酶混合液	1.26mL/管×2	Taq 酶、dNTPs、MgCl ₂ 、缓冲液
		2	SFRP2 反应液	120μL/管×1	SFRP2 基因引物、探针
		3	SDC2 反应液	120μL/管×1	SDC2 基因引物、探针
		4	β-actin 反应液	120μL/管×1	β-actin 基因引物、探针
	对照品	5	阴性对照	20μL/管×1	人非甲基化全基因组 DNA
		6	阳性对照	20μL/管×1	人甲基化全基因组 DNA
		7	空白对照	1.2mL/管×1	无核酸酶水

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粪便样本中肠道脱落细胞的 SFRP2 和 SDC2 基因的甲基化。本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，检测结果仅供临床参考。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。

基因 DNA 高度甲基化是结直肠癌发生发展中的一个早期事件。SFRP2 基因（分泌型卷曲相关蛋白 2）是 SFRP 家族一员，包含富

集半胱氨酸的结构域，该结构域与卷曲蛋白 Wnt 结合位点同源。SFRPs 主要作用于 Wnt 信号通路，是可溶的调节因子。SFRP2 基因甲基化可以在结直肠癌组织、腺瘤组织以及异常隐窝病灶中检测到，但正常结直肠粘膜组织中，SFRP2 基因都是未甲基化的。粪便 DNA 中 SFRP2 甲基化，从正常人群到增生性息肉到腺瘤患者，是显著增加的，表明粪便 DNA 中 SFRP2 基因甲基化可能是潜在的非侵入性的结直肠癌诊断标志物。SDC2 基因编码人源长重组蛋白，多篇临床研究报道表明 SDC2 基因启动子区域甲基化可能对结直肠癌病变产生预示。实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

(三) 产品包装规格

48 人份/盒

(四) 产品检验原理

基于荧光定量 PCR 原理，针对结直肠癌特异的 SFRP2 基因转录本 NM_003013.2 上 0~200 位点范围内设计了甲基化特异 PCR 扩增引物 (MSP) 以及匹配的 Taqman MGB 甲基化特异探针，覆盖 10 个以上 CpG 二联体位点。同时针对结直肠癌特异的 SDC2 基因转录本 NM_002998.3 上 300~500 范围内设计了甲基化特异 PCR 扩增引物 (MSP) 以及匹配的 Taqman MGB 甲基化特异探针，覆盖 7 个 CpG 二联体位点。构建了 SFRP2 基因和 SDC2 基因甲基化检测反应体系以及内参基因 β -actin 基因反应体系，使用 FAM 通道收集

反应体系中待检测模板 SFRP2 基因和 SDC2 基因的扩增荧光信号，使用 VIC 通道收集反应体系中待检测模板 β -actin 基因的扩增荧光信号。

粪便样本人源 DNA 提取，使用核酸提取试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180535 号）。甲基化 DNA 的亚硫酸盐转化，使用核酸纯化试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180536 号）。

将纯化试剂盒获得的 DNA 作为模板，进行甲基化 PCR 扩增，在含有不同水平甲基化模板的情况下，甲基化 PCR 反应体系中对对应甲基化水平的反应得以正常进行并释放荧光信号，继而对样本甲基化水平进行分析及判读，内参基因的检测用于评估样本人源 DNA 提取质量、甲基化转化质量和 PCR 扩增效果，确保甲基化基因扩增的可靠性。

试剂盒同时设置了阳性对照、阴性对照和空白对照，需要在每一批试验同时检测，确保本次试验的有效性。

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 dNTP、引物、探针、Taq 酶。这些原材料均是通过外购的方式获得。

其中引物、探针的序列由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰、纯化方式获得；Taq 酶由原材料供应商克隆表达后获得；

dNTP 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技术要求和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阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品以及最低检测限参考品。

企业参考品的主要原材料为粪便样本、人甲基化全基因组 DNA 和人非甲基化全基因组 DNA。其中人甲基化全基因组 DNA 包括 SFRP2 基因和 SDC2 基因甲基化，人非甲基化全基因组 DNA 中 SFRP2 基因和 SDC2 基因相应位点均未发生甲基化。粪便样本均为临床来源，同时 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化状态经过 Sanger 测序方法验证。

阳性参考品包括 7 种，分别命名为阳性参考品 P1~P7。其中 P1~P3 为结直肠癌 I 期、II 期、III 期患者粪便样本；P4~P7 为按照比例配制的人甲基化全基因组 DNA 与人非甲基化全基因组 DNA 的混合样本。

阴性参考品包括 8 种，分别命名为 N1~N8，其中 N1~N3 为非肠癌患者粪便样本；N4~N7 为分别掺入不同干扰物质的健康人粪便样本；N8 为人非甲基化全基因组 DNA 样本。

精密度参考品包括 2 种，命名为精密度参考品 J1 和 J2，为不同比例的人甲基化全基因组 DNA 与人非甲基化全基因组 DNA 的

混合样本。

最低检测限参考品 1 种，命名为 L，为一定比例的人甲基化全基因组 DNA 与人非甲基化全基因组 DNA 的混合样本。

本试剂盒同时设置了阳性对照、阴性对照和空白对照，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 β -actin，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、Taq 酶用量的确定、 Mg^{2+} 浓度的确定、dNTP 浓度的确定、DTT 浓度的确定、单/双重反应体系的对比验证等；对 PCR 反应条件的研究包括 qPCR 延伸时间的确定和扩增循环数的优化；对样本的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度、最低检测限、精密度、分析特异性、核酸提取试剂及核酸纯化试剂性能研究，同时对粪便样本稳定性、粪便样本提取核酸稳定性及粪便样本转化后核酸稳定性进行了研究。

准确度研究中，选择了若干例临床粪便样本进行研究，得出灵敏度为 92.86%，特异性为 100%，符合率为 95%。腺瘤样本准确度

研究中，选择 57 例腺瘤粪便样本（其中 31 例高级别上皮内瘤变样本，26 例结直肠腺瘤样本）使用三个批次的人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行检测，并通过 Sanger 测序对样本 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化状态进行验证。研究结果显示，高级别上皮内瘤变样本的阳性检出率为 51.61%。Sanger 测序和试剂盒检测 SFRP2 基因、SDC2 基因甲基化结果一致性均为 100%。

最低检测限研究，以阴性粪便为基质，采用模拟样本和临床阳性稀释样本，使用三个批次的人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)分别进行最低检测限的建立和验证。明确了试剂盒的最低检测限为 10ng 人基因组 DNA 背景下，1%的 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化。

精密度研究通过不同地点、人员、轮次、日间和批次对弱阳性粪便样本及阴性粪便样本进行连续 20 天精密度研究，人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）检测结果变异系数均小于 10%。

分析特异性研究包含交叉反应研究和干扰研究，交叉反应研究包括其它消化道肿瘤常见的甲基化基因、转化前结直肠癌粪便样本、其他消化道肿瘤粪便样本、其他粪便中常见非人源性样本、其他粪便中常见病原体。干扰研究包括内、外源性干扰物质和粘液便样本干扰研究。

其它消化道肿瘤常见的甲基化基因交叉反应研究中，通过对其

它消化道肿瘤常见的甲基化基因 BMP3、NDRG4、Septin9、SOX17 和 TFPI2, 分别采用三个不同批次的人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)进行交叉反应研究, 结果显示本产品能够实现对 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化的特异性检测。

转化前结直肠癌粪便样本研究中, 使用三个批次的人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)分别检测转化前、后结直肠癌粪便样本 DNA, 结果显示本产品能够实现对 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化的特异性检测。

交叉反应研究中, 使用三个批次的人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)检测常见的其他消化道肿瘤粪便样本包括食管癌、胃癌、肝癌、胆管癌和胰腺癌共 5 种恶性肿瘤, 结果显示该产品与食管癌、胃癌、肝癌、胆管癌和胰腺癌均无交叉反应。

粪便中常见非人源性物质的特异性研究显示, 粪便中含有以下常见非人源性物质: 牛血红蛋白 (0.5mg/mL)、猪血红蛋白 (0.5mg/mL)、牛肉 (0.5 μ g/mL)、羊肉 (0.5 μ g/mL)、鱼肉 (0.5 μ g/mL)、菠菜 (0.5 μ g/mL)、白菜 (0.5 μ g/mL)、金针菇 (0.5 μ g/mL)、玉米 (0.5 μ g/mL)、青椒 (0.5 μ g/mL), 这 10 种非人源物质对本试剂盒检测结果均没有影响。

粪便中常见病原体的特异性研究显示, 粪便中含有以下常见病原体: 大肠杆菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、屎肠球菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、粪肠球菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、铜绿假单胞菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、金黄色

葡萄球菌(2.5×10^5 CFU/mL)对本试剂盒检测结果均没有影响。

干扰物质研究显示，粪便中含有不超过 0.288mg/g 的胆红素、3.75mg/g 的盐酸吉西他滨、0.475mg/g 的苯丁酸氮芥、1.75mg/g 的人血红蛋白对本试剂盒的检测结果显示没有影响。

粘液便干扰研究显示，粪便样本的粘液性状对本试剂盒的检测结果显示没有影响。

申请人采用临床粪便样本进行了核酸提取试剂性能研究和核酸纯化试剂性能研究，并根据与该产品的组合性能研究结果，确定推荐的核酸提取试剂和核酸纯化试剂符合检测要求。

(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粪便样本。阳性判断值研究入组（包括建立和验证）有效样本数共计 554 例，包括结直肠癌患者样本、结直肠腺瘤样本、结直肠息肉样本、结直肠炎症样本、肠道未见明显异常样本等。 β -actin 基因的 Ct 值 ≤ 38.5 时判定为样本有效。通过逻辑回归方程建立 Score 值计算公式，采用 ROC 曲线和约登指数确定试剂盒的阳性判断值为 20。当 Score 值 < 20 时，样本的检测结果为阴性；当 Score 值 ≥ 20 时，样本的检测结果为阳性。

阳性判断值验证结果显示：灵敏度为 93.40%，特异性为 95.24%，总符合率为 94.75%。

(五) 稳定性研究

申请人对该产品的稳定性研究包括货架效期稳定性、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(包括粪便、粪便提取 DNA 及粪便提取转化后 DNA 的稳定性)。

货架有效期稳定性: 将三批次试剂盒置于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存条件下放置 0、3、6、9、12、14 个月, 每到一个时间节点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测, 结果显示试剂盒在生产后保存至 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

本产品在中国人民解放军总医院第七医学中心、蚌埠医学院第一附属医院、南京大学医学院附属鼓楼医院和山西省肿瘤医院四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, 样本类型为粪便。产品临床灵敏度和特异度评价共纳入临床有效病例 1235 例, 其中结直肠癌病例 435 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 800 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 92.2% (95%CI: 89.3% ~ 94.4%), 特异度为 91.9% (95%CI: 89.8% ~ 93.6%), 总符合率为 91.9% (95%CI: 90.3% ~ 93.4%)。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 279 例结直肠癌疑似病例，采用试验体外诊断试剂与一代测序进行比较研究，确认本产品的临床检测性能。试验结果显示：针对 SFRP2 基因，阳性符合率为 100%（95%CI: 96.5%~100%），阴性符合率为 100%（95%CI: 97.8%~100%），总符合率为 100%（95%CI: 98.6%~100%）；针对 SDC2 基因，阳性符合率为 100%（95%CI: 96.6%~100%），阴性符合率为 100%（95%CI: 97.8%~100%），总符合率为 100%（95%CI: 98.6%~100%）。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，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》对人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）进行产品受益风险判定。

（一）受益评估

该产品适用于临床医师建议做肠镜检测的患者的辅助诊断，不能作为肿瘤早期诊断或确诊的依据，检测结果仅供临床参考，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判断。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测的患者提供一种结直肠癌辅助诊断方法的选择。检测结果为阳性患者体内有结直肠癌或高级别上皮内瘤变的可能性大，从而促进这部分人群顺应肠镜

检查，获得及时的诊断和治疗。通过4家中心1235例临床试验证实，本试剂盒对结直肠癌的灵敏度为92.2%（95%CI: 89.3%~94.4%），除腺瘤外非结直肠癌的特异性为95.8%（95%CI: 94.0%~97.2%），对高级别上皮内瘤变的检出率为62.9%（95%CI: 44.9%~78.5%）。

（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，例如本产品的检测结果非唯一诊断依据，医生未结合其他诊断方法进行综合诊断。阳性结果不能作为确诊依据，阴性结果也不能作为排除的依据。

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。

通过对人类SFRP2和SDC2基因甲基化联合检测试剂盒（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，从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控制和风险防范措施，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:

本产品用于体外定性检测人粪便样本中肠道脱落细胞的SFRP2和SDC2基因的甲基化。本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结直肠癌辅助诊断方法的选择。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

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册，属于境内同品种首个产品。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（中华人民共和国国务院令 第 739 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 2014 年第 5 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。

2022 年 5 月 10 日

附件：产品说明书

人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)

说明书

【产品名称】

通用名称：人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人粪便样本中肠道脱落细胞的 SFRP2 和 SDC2 基因的甲基化。

本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，检测结果仅供临床参考。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。

基因 DNA 高度甲基化是结直肠癌发生发展中的一个早期事件。SFRP2 基因（分泌型卷曲相关蛋白 2）是 SFRP 家族一员，包含富集半胱氨酸的结构域，该结构域与卷曲蛋白 Wnt 结合位点同源。SFRPs 主要作用于 Wnt 信号通路，是可溶的调节因子。SFRP2 基因甲基化可以在结直肠癌组织、腺瘤组织以及异常隐窝病灶中检测到，但正常结直肠粘膜组织中，SFRP2 基因都是未甲基化的。粪便 DNA 中 SFRP2 甲基化，从正常人群到增生性息肉到腺瘤患者，是显著增加的，表明粪便 DNA 中 SFRP2 基因甲基化可能是潜在的非侵入性的结直肠癌诊断标志物。SDC2 基因编码人源长重组蛋白，多篇临床报道表明 SDC2 基因启动子区域甲基化可能对结直肠癌病变产生预示。

实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

【检验原理】

基于荧光定量 PCR 原理，针对结直肠癌特异的 SFRP2 基因转录本 NM_003013.2 上 0~200 位点范围内设计了甲基化特异 PCR 扩增引物 (MSP) 以及匹配的 Taqman MGB 甲基化特异探针，覆盖 10 个以上 CpG 二联体位点。同时针对结直肠癌特异的 SDC2 基因转录本 NM_002998.3 上 300~500 范围内设计

了甲基化特异 PCR 扩增引物(MSP)以及匹配的 Taqman MGB 甲基化特异探针，覆盖 7 个 CpG 二联体位点。构建了 SFRP2 基因和 SDC2 基因甲基化检测反应体系以及内参基因 β -actin 基因反应体系，使用 FAM 通道收集反应体系中待检测模板 SFRP2 基因和 SDC2 基因的扩增荧光信号，使用 VIC 通道收集反应体系中待检测模板 β -actin 基因的扩增荧光信号。

粪便样本人源 DNA 提取，使用核酸提取试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180535 号）。甲基化 DNA 的亚硫酸盐转化，使用核酸纯化试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180536 号）。

将纯化试剂盒获得的 DNA 作为模板，进行甲基化 PCR 扩增，在含有不同水平甲基化模板的情况下，甲基化 PCR 反应体系中对对应甲基化水平的反应得以正常进行并释放荧光信号，继而对样本甲基化水平进行分析及判读，内参基因的检测用于评估样本人源 DNA 提取质量、甲基化转化质量和 PCR 扩增效果，确保甲基化基因扩增的可靠性。

试剂盒同时设置了阳性对照、阴性对照和空白对照，需要在每一批试验同时检测，确保本次试验的有效性。

【主要组成成分】

	功能	序号	组分名称	规格和装量	主要成分
人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒	扩增反应试剂	1	qPCR 反应酶混合液	1.26mL /管×2	Taq 酶、dNTPs、MgCl ₂ 、缓冲液
		2	SFRP2 反应液	120 μ L/管×1	SFRP2 基因引物、探针
		3	SDC2 反应液	120 μ L/管×1	SDC2 基因引物、探针
		4	β -actin 反应液	120 μ L/管×1	β -actin 基因引物、探针
对照品		5	阴性对照	20 μ L/管×1	人非甲基化全基因组 DNA

	6	阳性对照	20 μ L/管 $\times$ 1	人甲基化全基因组 DNA
	7	空白对照	1.2mL/管 $\times$ 1	无核酸酶水

注：不同批号试剂盒中各组分不能互换。

本试剂盒不包含，但需配套使用的试剂和分析软件如下：

用途	试剂盒名称	分类	注册/备案证号
粪便标本采集	粪便标本采集保存管（上海锐翌生物科技有限公司生产）	一类	沪闵械备 20180545 号
核酸提取	核酸提取试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产）	一类	沪闵械备 20180535 号
核酸纯化	核酸纯化试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产）	一类	沪闵械备 20180536 号
数据分析	人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒(荧光 PCR 法)阳性判断值分析软件 V1.0（上海锐翌生物科技有限公司生产）	二类	

注：配套使用的试剂及软件应明确医疗器械分类，获得上市许可或经备案后使用。

以下的试剂和耗材是本试剂盒中不包含，但对该试验是必需的：

- 1.5mL 无菌离心管；
- 各种规格带滤芯的无菌枪头；
- 0.2mL 荧光定量 PCR 专用八连管和透明管盖（ABI7500 专用）；

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒应避光保存。PCR 扩增反应试剂及对照品置于-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 保存。
2. 试剂盒在正确储存条件下有效期 12 个月，应避免反复冻融。
3. 试剂盒开瓶后-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 可储存 30 天，冻融次数应不超过 5 次；试剂盒用泡沫箱加干冰密封运输，运输时间不超过 3 天。
4. 生产日期、有效期见包装标签。

【适用仪器】

2

1. 普通实验室设备

以下的实验室常规设备是本试剂盒使用所必要的。所有的实验室设备必须按照设备供货商的要求进行标定、操作以及维护。

- 1) 能容纳 2mL 离心管的试管架；
- 2) 涡旋混匀仪；
- 3) 高精密度，量程从 2-100 μ L, 100-1000 μ L 的移液器；
- 4) 台式离心机，能离心 1.5/2.0mL 的离心管。

2. 需要的特殊设备和耗材

ABI7500 仪器是本试剂盒检测所必要的，不能被其它设备所取代。需要按照设备供货商的要求进行标定、操作以及维护。

- 1) Applied Biosystems 7500 PCR 仪器（Life Technologies Co. 货号 4351105 或 4351104），附带 Sequence Detection Software 软件模块；
- 2) 可以兼容实时定量 PCR 仪器的配件。

【样本要求】

1. 适用样本类型：粪便样本，取样量在 0.8g~2.5g。
2. 样本采集：严格按照粪便标本采集保存管（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180545 号）说明书中的标准方法进行样本的采集和保存。
3. 检测机构在收到粪便样本后建议立刻进行 DNA 的提取及纯化（亚硫酸盐）处理、荧光 PCR 的检测，否则建议将含有样本保存液的粪便样本混匀，于-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 保存不超过 6 个月。粪便样本避免反复冻融，冻融次数不超过 10 次。
4. 提取后的粪便 DNA 建议立即进行纯化，否则请于-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 保存，保存时间不超过 1 个月。粪便 DNA 应避免反复冻融，冻融次数不超过 10 次。提取并纯化（亚硫酸盐）处理完的 DNA 建议立即检测，否则请于-70 $^{\circ}$ C 以下保存，保存时间不要超过 14 天。亚硫酸盐处理完的 DNA 冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

1. 核酸提取及核酸纯化操作见各自说明书。

2. 试剂和耗材准备

扩增反应试剂使用前应先置于 4 $^{\circ}$ C 待其充分溶解，并瞬时离心。加样本使用

前 10min 移至常温。

3. SFRP2 和 SDC2 基因甲基化水平检测

3.1 试剂的制备（试剂准备区）

(1) 从-20°C冰箱中取出 SFRP2 基因、SDC2 基因和 β -actin 基因反应液、qPCR 反应酶混合液以及空白对照，先在 4°C 充分融化，快速离心 10s；

(2) 按照每孔每个样本 17.5 μ L qPCR 反应酶混合液分别分装至 PCR 反应管中。

(3) 按照每孔每个样本 2.5 μ L SFRP2 基因、SDC2 基因或 β -actin 基因反应液分别分装至对应 PCR 反应管中，空白对照每个反应孔加入 15 μ L 空白模板，轻盖反应管。

(4) PCR 管转移至样本制备区，剩余试剂放回-20°C冰箱冷冻避光保存。

3.2 样本制备（样本制备区）

3.2.1 核酸提取：按照核酸提取试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180535 号）说明书进行操作。

3.2.2 核酸纯化：按照核酸纯化试剂盒（上海锐翌生物科技有限公司生产，备案号：沪闵械备 20180536 号）说明书进行操作。

3.2.3 加样：

(1) 将核酸纯化试剂盒获得的 DNA 依次取 15 μ L 加入已经装有 SFRP2、SDC2 和 β -actin 反应液的反应管中，即每个待测样本分别用这三种反应液进行检测。

(2) 盖紧 PCR 反应管，混匀后，瞬离溶液至管底，避免出现气泡。

(3) 配好后的 PCR 反应体系应尽快安排上机，不能将加好模板的 PCR 反应管放于 2~8°C 超过 30min，否则可能导致实验失败。

3.3 PCR 设置（核酸扩增区）

(1) 开机，并进行仪器性能自检。

(2) 取在样本制备区准备好的 PCR 反应管，放在仪器样品槽相应位置。并记录放置顺序。

(3) 设置仪器扩增相关参数，并开始进行 PCR 扩增。

表 1 PCR 仪器扩增相关参数

体系	总体积为 35 μ L
信号采集	SFRP2 基因甲基化-FAM 通道采集荧光信号； SDC2 基因甲基化-FAM 通道采集荧光信号；

		β -actin 基因-VIC 通道采集荧光信号	
PCR 反应条件	阶段	条件	循环数
	预变性, Taq 酶活化	95°C, 5min	1
	PCR 扩增	95°C, 15s	48
		60°C, 40s (设置在此阶段结束时采集荧光信号)	
仪器冷却	25°C, 10s	1	

设置好后，保存文件，运行反应直至完成。

3.4 结果分析

反应结束后，调整基线 10-22 循环，根据扩增曲线，划定合适荧光阈值。 β -actin 阈值设定原则以阈值线处于阳性对照的指数扩增期的初始阶段拐点处为准；SFRP2 和 SDC2 阈值设定原则以阈值线超过阴性对照的最高点，且处于阳性对照的指数扩增期的初始阶段拐点处为准；然后得到不同通道 Ct 值，运用《人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）阳性判断值分析软件》V1.0（以下简称阳性判断值软件）进行分析，得到 Score 值，并进行结果判读。

【阳性判断值】

1. 当 Score 值 < 20 时，该样本的检测结果为阴性，不排除该样本含阳性靶标但浓度低于本试剂盒的检测下限。

2. 当 Score 值 $\geq$ 20 时，该样本的检测结果为阳性，建议通过结肠镜或其他临床诊断方法进一步确诊。

【检验结果的解释】

1. 试剂盒有效性判定

(1) 阳性对照： β -actin 基因的 VIC 通道 Ct 值 $\leq$ 36.5；SFRP2 基因和 SDC2 基因的 FAM 通道 Ct 值均 $\leq$ 38；三个基因的扩增曲线均有明显指数增长期。运用阳性

判断值软件分析后 Score 值 > 20。

(2) 阴性对照: β -actin 基因的 VIC 通道 Ct 值 ≤ 36.5 , 且扩增曲线有明显指数增长期; SFRP2 基因和 SDC2 基因的 FAM 通道均无扩增曲线。运用阳性判断值软件分析后 < 20 。

(3) 空白对照: β -actin 基因的 VIC 通道和 SFRP2 基因和 SDC2 基因的 FAM 通道均无扩增曲线, β -actin 基因 Ct 值 > 40 或无 Ct 值; SFRP2 基因和 SDC2 基因的 Ct 值 > 42 或无 Ct 值。

(4) 以上条件均满足时表明试剂盒有效, 继续后续判断。

2. 样本有效性判定

(1) 内参 β -actin 基因: 所有样本检测中 VIC 通道 Ct 值 ≤ 38.5 , 扩增曲线有明显指数增长期。

(2) 如样本 β -actin 基因不满足以上要求, 视为样本无效。满足样本有效性条件方可进行后续分析判断。

3. 检测结果的判定

根据上述步骤 1 和 2 确定检测的有效性后, 对样本检测结果进行判定, 确定样本的 SFRP2 基因和 SDC2 基因甲基化水平。

样本 β -actin 基因满足 Ct 值 ≤ 38.5 时, 运用阳性判断值软件分析后得到 Score 值。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 不能作为结直肠癌确诊的依据, 对患者个体化治疗的选择应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 阴性结果不能完全排除 SFRP2 基因和 SDC2 基因甲基化的存在, 样本中肿瘤细胞过少、核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因拷贝数低于检测限亦可造成阴性结果。

3. 本试剂盒的检测结果与样本的收集、处理和保存质量有关, 其中任何失误都将导致检测结果的不准确, 如不合理的样本采集、转运及处理、以及不当的试验操作和实验环境均有可能导致假阴性或者假阳性结果。

4. 留便样本异常 (如便溏等) 需重新采集样本检测。

【产品性能指标】

1. 外观和性状: 试剂盒外包装完整, 无内容物溢出; 标签外观完整, 无脱落,

标签标识内容字迹清晰; 试剂盒内组分正确无重复和缺失组分的情况。

2. 净含量: 各液体组分净含量要求不低于标示量。

3. 准确度:

3.1 阳性符合率:

检测企业阳性参考品 (P1~P7), 检测结果应均为阳性。

3.2 阴性符合率

3.2.1 分析特异性:

3.2.1.1 检测企业阴性参考品 (N1、N8), 检测结果应均为阴性。

3.2.1.2 检测可能引起非特异性反应的企业阴性参考品 (N2、N3), 检测结果应均为阴性。

3.2.2 干扰物质: 检测含有规定浓度的干扰物质的企业阴性参考品 (N4~N7), 检测结果应均为阴性。

3.3 选择了若干例临床粪便样本进行准确度研究, 得出灵敏度为 92.86%, 特异性为 100%, 符合率为 95%。腺瘤样本准确度研究中, 选择 57 例腺瘤粪便样本 (其中 31 例高级别上皮内瘤变样本, 26 例结直肠腺瘤样本) 使用三个批次的人类 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化联合检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 进行检测, 并通过 Sanger 测序对样本 SFRP2 和 SDC2 基因甲基化状态进行验证。研究结果显示, 高级别上皮内瘤变样本的阳性检出率为 51.61%。Sanger 测序和试剂盒检测 SFRP2 基因、SDC2 基因甲基化结果一致性均为 100%。

4. 最低检测限:

4.1 检测企业最低检测限参考品 (L), 重复检测 20 次, 至少 17 次检测结果为阳性。

4.2 使用临床阴性粪便样本为背景基质, 添加不同比例的人甲基化全基因组 DNA 和人非甲基化全基因组 DNA 混匀后, 进行最低检测限研究。使用临床阴性粪便样本为背景基质, 对临床结直肠癌患者粪便样本进行不同梯度稀释, 进行最低检测限验证。结果表明: 试剂盒可在 10ng 人基因组 DNA 背景下检测出不低于 1% 水平的 SFRP2/SDC2 基因甲基化。

5. 精密度:

5.1 检测精密度参考品 (J1、J2), 各重复检测 10 次, 计算所得 Score 值的变异系数 (CV) 均不高于 5%。

5.2 使用弱阳性粪便样本和阴性粪便样本分别对三批次试剂盒在 ABI7500 荧光 PCR 仪上由两位实验人员在不同实验室进行连续 20 天的检测。结果显示试剂盒对临床粪便样本在日内、日间、人员间、设备间、实验室间、批间 Score 值的 CV 值均不高于 10%。

6. 使用本试剂盒近效期的产品，检测企业参考品，结果仍然符合要求。

7. 其它干扰及交叉反应

本试剂盒检测结果不受浓度低于以下水平物质的干扰：

牛血红蛋白 (0.5mg/mL)、猪血红蛋白 (0.5mg/mL)，牛肉 (0.5μg/mL)、羊肉 (0.5μg/mL)、鱼肉 (0.5μg/mL)、菠菜 (0.5μg/mL)、白菜 (0.5μg/mL)、金针菇 (0.5μg/mL)、玉米 (0.5μg/mL)、青椒 (0.5μg/mL) 对本试剂盒检测结果没有影响。

大肠杆菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、屎肠球菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、粪肠球菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、铜绿假单胞菌 (2.5×10^5 CFU/mL)、金黄色葡萄球菌 (2.5×10^5 CFU/mL) 对本试剂盒检测结果没有影响。

常见其他消化道肿瘤甲基化基因 (BMP3、NDRG4、Septin9、SOX17 和 TFPI2) 对本试剂盒检测结果没有影响。

粪便样本的粘液性状对本试剂盒检测结果没有影响。

8. 临床性能：在 4 家临床试验机构完成临床试验，临床研究共入组有效样本 1235 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 92.2%，特异度为 91.9%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 实验前请熟练掌握涉及到的各种仪器操作及其注意事项。
3. 实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因检测实验室的管理规范执行。实验人员必须进行专业培训；实验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增区和产物分析区），实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严

格要求，最大限度避免交叉污染；实验用消耗品（如离心管、吸头等）应有合理的清洁和质检程序，避免污染或扩增反应抑制物造成假阴性或假阳性结果。

4. 试剂盒各组份使用前请充分融化并摇匀，离心管内的微量试剂需瞬离至管底后使用。

5. 样本采集及储存过程避免样本间交叉污染，在样本处理阶段建议使用生物安全柜。

6. 实验过程中若出现标本或试剂污染工作台和移液器，及时用 10% 次氯酸钠或 75% 酒精处理。试验结束后立即清洁工作台，定期对工作及实验用品进行消毒。

7. 所有的化学药品都有一定的危险性，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措施。产品在使用过程中如不慎溅入眼内应立即用冲眼器或大量清水冲洗眼睛。

8. 本试剂盒内阳性对照和阴性对照不具有传染性。但在使用时建议将其视为具有潜在传染物质进行处理。

9. 阳性对照和阴性对照（各取 5μL，并用纯化水补齐到 20μL）需使用核酸纯化试剂盒进行预先处理，获得纯化 DNA 后按照本说明书的要求进行检测，实验室应同时进行空白对照检测。

10. 本试剂盒用剩的试剂及实验过程中的废弃物建议按照医疗废弃物进行处理。

11. 不同批号的试剂盒不能混用。

12. 若发现本产品组分颜色、性状改变请勿使用。

13. 使用前检查产品完整性。

14. 粪便样本采集须使用上海锐翌生物科技有限公司生产的粪便标本采集保存管（备案号：沪闵械备 20180545 号）进行样本采集，从采样到样本接收不应超过 72 小时。

15. 核酸提取试剂须使用上海锐翌生物科技有限公司生产的核酸提取试剂（备案号：沪闵械备 20180535 号）。核酸纯化试剂须使用上海锐翌生物科技有限公司生产的核酸纯化试剂（备案号：沪闵械备 20180536 号）。

【标识的解释】无

【参考文献】

1. 王裴, 张明鑫, 张超, 等. 粪便 DNA 甲基化检测在结直肠癌早期诊断中的研究进展[J]. 现代肿瘤医学, 2015, 23(6):7.
2. 刘纲毅, 黄志卓, 张明明. DNA 异常甲基化与结直肠癌研究进展[J]. 广西医学, 2017, 39(2):248-251.
3. 贾凤洁, 孙冬生, 徐龙健, 等. 粪便中 SFRP2 基因甲基化与大肠癌的相关性[J]. 中国老年学杂志, 2015(5).
4. 汤东, 薛彦俊, 傅文杰, 等. 探讨 SFRP2 基因甲基化在大肠癌筛查中的作用[J]. 中国现代普通外科进展, 2009, 12(5):5.
5. Yang Q, Huang T, Ye G, *et al.* Methylation of SFRP2 gene as a promising noninvasive biomarker using feces in colorectal cancer diagnosis: a systematic meta-analysis:[J]. *Sci Rep*, 2016, 6:33339.
6. Sui C, Ma J, Chen Q, *et al.* The variation trends of SFRP2 methylation of tissue, feces, and blood detection in colorectal cancer development[J]. *European Journal of Cancer Prevention the Official Journal of the European Cancer Prevention Organisation*, 2016, 25(4):288.
7. Oh T, Kim N, Moon Y, *et al.* Genome-wide identification and validation of a novel methylation biomarker, SDC2, for blood-based detection of colorectal cancer.[J]. *Journal of Molecular Diagnostics Jmd*, 2013, 15(4):498-507.
8. Oh T J, Oh H I, Seo Y Y, *et al.* Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer[J]. *Clinical Epigenetics*, 2017, 9(1):126.
9. Barták B K, Kalmár A, Péterfia B, *et al.* Colorectal adenoma and cancer detection based on altered methylation pattern of SFRP1, SFRP2, SDC2, and PRIMA1 in plasma samples[J]. *Epigenetics*, 2017, 12(4):00-00.
10. Lanschot M C J V, Bosch L J W, Wit M D, *et al.* Early detection: the impact of genomics[J]. *Virchows Archiv An International Journal of Pathology*, 2017:1-9.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 上海锐翌生物科技有限公司

住所: 上海市闵行区新骏环路 138 号 6 幢 202-3、302 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 138 号 6 幢 202-3、302 室; 上海市闵行区新骏环路 245 号 E 幢 6 层 616 室

生产许可证编号:

生产日期、生产批号及有效期见产品包装盒

【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: 年 月 日

修改日期: 年 月 日