

受理号：CSZ2100041

## 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 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：安徽达健医学科技有限公司

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.....	12
四、 产品受益风险判定.....	15
综合评价意见.....	18

## 基本信息

### 一、申请人名称

安徽达健医学科技有限公司

### 二、申请人住所

芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房(中科芜湖科技园公司内)

### 三、生产地址

芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房(中科芜湖科技园公司内)

## 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

试剂盒 I: 亚硫酸氢盐转化试剂盒 (离心柱型)

组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
1.转化液	亚硫酸氢钠	2 管	5 管
2.缓冲液	NaOH	520 $\mu$ L	1.3mL
3.结合液	异硫氰酸胍	8mL	20mL
4.漂洗液	纯化水	2.4mL	6mL
5.脱磺液	NaOH	4mL	10mL
6.洗脱液	Tris-HCl、EDTA	600 $\mu$ L	1.5mL
7.吸附柱	硅胶膜	20 个	50 个
8.收集管	/	20 个	50 个

试剂盒 II: 荧光 PCR 扩增试剂盒

试剂组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份

PCR MIX	dNTP、10×PCR Buffer、DNA 聚合酶	400μL	1000μL
引物探针混合液 I	SDC2 基因/NPY 基因/内标基因的引物和探针	100μL	250μL
引物探针混合 II	PDX1 基因/FGF5 基因/内标基因的引物和探针	100μL	250μL
阴性对照品	正常人白细胞 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL
阳性对照品	肠癌细胞株 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL

## (二) 产品预期用途

本产品用于体外定性检测人粪便脱落细胞中SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4种基因甲基化状态。

本产品适用于结直肠癌高危、临床诊断需要进行结肠镜检查但因患者结肠镜依从性差或其他医学原因无法做结肠镜检查患者的辅助诊断。检测结果不作为肠癌早期诊断或确诊的依据

且不能替代结肠镜检查，仅作为辅助诊断供临床医师参考。不能用于普通人群的肿瘤筛查。

**SDC2**（黏结蛋白多糖2）是一种膜蛋白，参与细胞增殖、细胞迁移、与细胞外基质蛋白相互作用等，其甲基化被多项研究表明与结直肠癌的发生密切相关。**PDX1**（胰十二指肠同源盒蛋白1）是胚胎消化道发育分化和维持胰岛功能的关键转录因子。**FGF5**（纤维原细胞生长因子5）是一种生长因子，广泛促进中胚层和神经外胚层细胞的生长和分化，也被发现可以致癌并在多种肿瘤细胞株中表达。**NPY**（神经肽Y）属于神经肽家族，是中枢神经系统分布最丰富的神经递质及血管收缩素，与G蛋白偶联受体结合参与细胞生长、粘附及血管生成等。本产品检测**SDC2**、**NPY**、**FGF5**、**PDX1** 4种基因的甲基化状态可以通过对甲基化DNA的特异扩增而被检测到。研究发现，在大肠癌患者中，**SDC2**、**NPY**、**FGF5**、**PDX1** 4种基因呈高甲基化状态。

### （三）产品包装规格

20人份/盒、50人份/盒

### （四）产品检验原理

本产品包括两个步骤：

步骤I，用试剂盒I将提取的基因组DNA进行亚硫酸氢盐转化，未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。

步骤II，将步骤I中亚硫酸氢盐转化后的DNA（Bis-DNA）用试剂盒II进行多重荧光定量PCR扩增，试剂中甲基化特异性引物探针能与甲基化目的基因CpG序列特异性结合，可以在PCR反应中特异性地检测出甲基化CpG序列；内标基因（GAPDH）可监控每个样本的提取效果及PCR反应的扩增情况，从而有效避免假阴性或部分抑制结果的出现。另外，试剂盒中提供了阴性对照品和阳性对照品，需在每一次检测中同时检测阴性对照品和阳性对照品。

## 二、临床前研究概述

### （一）主要原材料

#### 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括 dNTP、Taq 酶、亚硫酸氢盐、引物和探针。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、亚硫酸氢盐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，通过功能性筛选出合格供应商，制定了主要原材料的技术要求和质量标准并经检验合格。

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出限参考品。

企业参考品的主要原材料为细胞株，粪便等样本 DNA，包括各基因相应位点甲基化阳性和阴性 DNA，这些 DNA 样本各基因的甲基化状态均经过数字 PCR 方法验证。

阳性参考品包括 8 种，分别命名为阳性参考品 P1-P8，为一定 DNA 浓度下各基因不同甲基化比例的样本。

阴性参考品包括 3 种，分别命名为阴性参考品 N1-N3，为一定 DNA 浓度下含有低于检测灵敏度的样本。

精密度参考品包括 3 种，分别命名为 J1-J3。

检出限参考品包括 8 种，分别命名为 L1-L8，为一定甲基化比例和浓度的样本。

本试剂盒同时设置了阳性对照和阴性对照，用于检测过程中的试剂和仪器的质量控制。此外，每个样本均检测内参基因 GAPDH，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、DNA 聚合酶用量的确定、PCR buffer 用量的确定、镁离子浓度的确定、dNTP 浓度的确定、PCR 反应体积的确定、PCR 模板体积的确定、转化液用量的确定、缓冲液浓度的确定、结合液浓度的确定、脱磺液浓度的确定等；对 PCR 反应条件的研究包括退火温度及时间、预变性温度及时间、变性时间、循环数等。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**

本产品分析性能评估内容包括准确度、精密度、分析灵敏度、分析特异性、不同规格性能研究、亚硫酸氢盐转化效率等研究，同时对粪便样本稳定性、粪便样本核酸提取液稳定性及粪便样本核酸转化后稳定性进行了研究。

准确度研究中，申请人分别使用三批试剂盒对阳性参考品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性符合率、阴性符合率均为 100%。同时选择了若干临床样本对试剂盒的检测准确性进行研究，研究结果显示试剂盒检测结果与测序结果阳性符合率均为 100%、阴性符合率均大于 96%。

精密度研究中，分别用三批次试剂盒由两位操作者在 20 天进行连续的检测。结果显示试剂盒对精密度参考品的批内、日间、批间、仪器、人员和地点间的检测变异系数均小于等于 5%。

分析灵敏度研究中，以阴性粪便样本为基质，采用不同浓度、不同甲基化比例的模拟样本，每个浓度梯度的样本检测 20 次进行最低检出限的确认。使用三个批次的试剂盒，用多例真实临床样本在最低检出限浓度水平上进行最低检出限验证。明确了试剂盒的最低检出限为 10ng/uL 的野生型 DNA 背景下，5% 的各基因甲基化 DNA。

分析特异性研究包含交叉反应和干扰研究，交叉反应研究包括其他基因甲基化的样本和常见肠道微生物样本、转化前结肠直肠癌粪便样本、粪便中常见的非人源性样本，均无交叉反应；用三批试剂盒检测其他恶性肿瘤患者粪便样本，包括口腔癌、食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌，结果显示均无交叉反应。

干扰试验结果显示，粪便样本中含有以下干扰物：胆红素（0.20mg/mL）、胆固醇（5mg/mL）、血红蛋白（5.00mg/mL）、甘油三酯（1.50mg/mL）、食物残渣中动物 DNA（500ng/ml）、植物 DNA（500ng/ml）、植物油（10 $\mu$ l/ml）等，常用口服抗生素如四环素（10.65mg/ml）、青霉素（2.56mg/ml）等，常用胃药吗丁啉（0.14mg/ml）、胃药斯达舒（6.84mg/ml），甘露醇

(75mg/ml)、通便灵胶囊(7.25mg/ml)、痔疮膏(24.75mg/ml)、布洛芬胶囊 75 $\mu$ g/ml、奥美拉唑(2.82mg/ml)、头孢克肟(20.5mg/ml)、盐酸左氧氟沙星(0.15mg/ml)、西咪替丁(2mg/ml)以及肿瘤治疗药物去氧氟尿苷片(3 $\mu$ g/ml)、贝伐珠单抗(2.5mg/ml)、瑞戈非尼(7.5 $\mu$ g/ml)，对检测结果无影响。黄连素(9.23mg/ml)对检测结果有影响，因此患者取样前1天应注意勿服用药物黄连素。

申请人采用临床粪便样本进行了核酸提取试剂盒性能研究，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437例，样本来源包括结直肠癌患者、肝癌患者、胃癌患者、食管癌患者、胰腺癌患者、肠炎、肠道未见明细异常人群等。

采用百分位数法确定内标基因的Ct值的范围；内标基因Ct值 $\leq 25$ 时判定样本合格。

使用风险值(P值)计算公式分析靶标基因检测结果Ct值(保留整数)，获得样本风险值(P值)，再用统计学上的约登指数来确定最合适的灵敏度和特异性所对应的Cut-off值，使用

ROC 法进行计算，Cut-off 值为 5.00 时诊断效能最优。即样本检测结果  $P$  值  $\geq 5.00$  时，样本检测结果为阳性；样本检测结果  $P$  值  $< 5.00$  时，样本检测结果为阴性。

### **(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。

货架有效期稳定性：将三批试剂盒置于规定储存条件下放置 0、2、4、6、8 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 8 个月各项性能指标均符合产品技术要求，产品有效期 6 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，产品的性能均能满足产品说明书的声称。

## **三、临床评价概述**

申请人在中山大学肿瘤防治中心、安徽省肿瘤医院和哈尔滨医科大学附属肿瘤医院共三家临床试验机构开展临床试验。

临床试验包括以下三方面：

第一，采用试验体外诊断试剂与相关疾病诊断的临床参考标准进行比较研究，确认本产品的临床性能。其中，结直肠癌及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。临床试验入组受试者主要为医生建议进行结肠镜检查的患者，具体包括不同分期结直肠癌患者、结直肠癌前病变患者、消化道良性疾病患者等，同时纳入部分其他消化道肿瘤患者进行特异性评价。样本类型为人粪便样本。临床试验共纳入结直肠癌患者 419 例（覆盖结直肠癌 I、II、III、IV 期），癌前病变患者 172 例（包括进展期腺瘤患者 124 例，其中高级别瘤变患者 33 例），非结直肠癌或癌前病变的其他病例 856 例（包括各种消化道良性疾病病例和其他消化道肿瘤病例等）。试验结果显示：本产品对于结直肠癌患者的临床灵敏度为 91.17%（95%CI: 88.07%，93.53%），对于结直肠癌前病变患者临床灵敏度为 67.44%（95%CI: 60.12%，74.00%），对于进展期腺瘤患者临床灵敏度为 75.81%（95%CI: 67.57%，82.50%），对于高级别瘤变患者临床灵敏度为 84.85%（95%CI: 69.08%，93.35%）。对于非结直肠癌或癌前病变的其他病例临床特异性为 91.12%（95%CI: 89.03%，92.85%）。

第二，采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序对比，评价四项基因甲基化检测性能，具体包括如下两项研究：（1）采用试

验体外诊断试剂与 Sanger 测序法分别检测受试者粪便样本，评价两种方法检测四项基因甲基化的一致性。临床试验共入组需进行肠镜检查患者 182 例，试验结果显示：两种方法检测 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 四基因甲基化的阳性符合率分别为 100%（95%CI: 94.80%，100%）、98.75%（95%CI: 93.25%，99.78%）、100%（95%CI: 93.58%，100%）和 98.32%（95%CI: 94.08%，99.54%）；阴性符合率分别为 99.11%（95%CI: 95.12%，99.84%）、98.04%（95%CI: 93.13%，99.46%）、99.21%（95%CI: 95.64%，99.86%）和 98.41%（95%CI: 91.54%，99.72%）。（2）采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序法分别检测受试者粪便样本和同源结直肠病变组织样本中的四项基因甲基化，并进行一致性评价。临床试验共入组需进行结肠镜检查患者 147 例，试验结果显示，两种方法检测 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 四基因甲基化的阳性符合率点估计值不低于 97%，阴性符合率点估计值均为 100%。

第三，临床试验中针对 47 例结直肠癌患者手术前后样本进行连续监测，结果显示，对于术前检测阳性的 42 例患者，37 例术后检测结果为阴性。

上述结果显示试验体外诊断试剂临床检测性能满足要求。

#### 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 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）进行产品受益风险判定。

##### （一）受益评估

本产品适用于结直肠癌高危、临床诊断需要进行结肠镜检查但因患者结肠镜依从性差或其他医学原因无法做结肠镜检查患者的辅助诊断，检测结果不作为肠癌早期诊断或确诊的依据且不能替代结肠镜检查，仅作为辅助诊断供临床医师参考。不能用于普通人群的肿瘤筛查。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：该产品作为临床医生建议做肠镜检查的患者提供一种无创的结直肠癌辅助诊断方法的选择，检测结果为阳性的患者体内有结直肠癌或进展期腺瘤的可能性大，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。依据现有的临床试验结果，其对结直肠癌患者临床灵敏度为 91.17%，非结直肠癌或癌前病变患者临床特异性为 91.12%，对进展期腺瘤的灵敏度为 75.81%。

##### （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. 与预期用途有关的风险，例如本产品不能作为结直肠癌早期诊断或确诊的依据，临床医生未结合其他诊断方法进行综合诊断。

2. 与生产过程相关的风险，例如说明书印刷错误。

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。

4. 与使用有关的风险，例如使用非推荐的提取试剂或荧光定量 PCR 仪。

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 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）从生产原料、配制、检测、标志、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，从产品技术要求和使用说明书及企业规章制度对产品质量的全过程控制和风险防控措施，已将产品的风险系数降低到了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，但是为保障用械安全，基于对主要剩余风险的控制已在该试剂盒说明书提示以下信息：

#### 预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人粪便脱落细胞中 **SDC2**、**NPY**、**FGF5**、**PDX1** 4 种基因甲基化。

该产品适用于结直肠癌高危、临床诊断需要进行结肠镜检查但因患者结肠镜依从性差或其他医学原因无法做结肠镜检查患者的辅助诊断。检测结果不作为肠癌早期诊断或确诊的依据且不能替代结肠镜检查，仅作为辅助诊断供临床医师参考。不能用于普通人群的肿瘤筛查。具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判断。阳性结果需要进一步接受肠镜检查；阴性结果表示受检者体内有结直肠癌和/或进展期腺瘤的可能性低，但并不能完全排除疾病风险，必要时仍建议进行肠镜检查。本产品不能替代肠镜，不能用于普通人群的结直肠癌筛查。

警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检测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》（国务院令第 680 号）、《体外诊断试剂注册管理办法》（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，经系统评价后，建议准予注册。

2023 年 7 月 10 日

附件：产品说明书

## 人 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 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 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 20 人份/盒、50 人份/盒

### 【预期用途】

本产品用于体外定性检测人粪便脱落细胞中 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 种基因甲基化状态。

本产品适用于结直肠癌高危、临床诊断需要进行结肠镜检查但因患者结肠镜依从性差或其他医学原因无法做结肠镜检查患者的辅助诊断。检测结果不作为肠癌早期诊断或确诊的依据且不能替代结肠镜检查，仅作为辅助诊断供临床医师参考。不能用于普通人群的肿瘤筛查。

SDC2（黏结蛋白多糖 2）是一种膜蛋白，参与细胞增殖、细胞迁移、与细胞外基质蛋白相互作用等，其甲基化被多项研究表明与结直肠癌的发生密切相关。PDX1（胰十二指肠同源盒蛋白 1）是胚胎消化道发育分化和维持胰岛功能的关键转录因子。FGF5（纤维原细胞生长因子 5）是一种生长因子，广泛促进中胚层和神经外胚层细胞的生长和分化，也被发现可以致癌并在多种肿瘤细胞株中表达。NPY（神经肽 Y）属于神经肽家族，是中枢神经系统分布最丰富的神经递质及血管收缩素，与 G 蛋白偶联受体结合参与细胞生长、粘附及血管生成等。本产品检测 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 种基因的甲基化状态可以通过 DNA 的特异扩增而被检测到。研究发现，在大肠癌患者中，SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 种基因呈高甲基化状态。

### 【检验原理】

本产品包括以下两个步骤：

步骤 I，用试剂盒 I 将提取的基因组 DNA 进行亚硫酸氢盐转化，未发生甲基化的胞嘧啶被转化为尿嘧啶，而甲基化的胞嘧啶不变。

步骤 II，将步骤 I 中亚硫酸氢盐转化后的 DNA（Bis-DNA）用试剂盒 II 进行多重荧光定量 PCR 扩增，试剂中甲基化特异性引物探针能与甲基化目的基因 CpG 序列特异性结合，可以在 PCR 反应中专一地检测出甲基化 CpG 序列；内标基因（GAPDH）可监控每个样本的提取效果及 PCR 反应的扩增情况，从而有效避免假阴性或部分抑制结果的出现。另外，试剂盒中提供了阴性对照品和阳性对照品，需在每一次检测中同时检测阴性对照品和阳性对照品。

### 【主要组成成分】

#### 试剂盒 I：亚硫酸氢盐转化试剂盒（离心柱型）

组分	主要成分	体积/数量	
		20 人份	50 人份
1.转化液	亚硫酸氢钠	2 管	5 管
2.缓冲液	NaOH	520μL	1.3mL
3.结合液	异硫氰酸胍	8mL	20mL
4.漂洗液	纯化水	2.4mL	6mL

5.脱磺液	NaOH	4mL	10mL
6.洗脱液	Tris-HCl、EDTA	600μL	1.5mL
7.吸附柱	硅胶膜	20 个	50 个
8.收集管	/	20 个	50 个

#### 试剂盒 II：荧光 PCR 扩增试剂盒

试剂组分	主要成分	体积	
		20 人份	50 人份
1.PCR MIX	dNTP、10×PCR Buffer、DNA 聚合酶	400μL	1000μL
2.引物探针混合液 I	SDC2 基因/NPY 基因/内标基因的引物和探针	100μL	250μL
3.引物探针混合液 II	PDX1 基因/FGF5 基因/内标基因的引物和探针	100μL	250μL
4.阴性对照品	正常人白细胞 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL
5.阳性对照品	肠癌细胞株 DNA 和 1×TE Buffer	60μL	100μL

注：1、不同批号的试剂盒中各组分不应互换使用。

2、本产品不包含核酸提取组分，使用安徽达健医学科技有限公司生产的《核酸提取或纯化试剂（离心柱型/粪便）》（备案号：皖芜械备 20220022 号，货号：ST50）提取粪便脱落细胞样本 DNA。

3、需要自备的试剂及耗材

- 无水乙醇（分析纯，浓度高于 99.5%）
- 1.5mL、2mL 收集管
- 带滤芯枪头，包括 100μL、200μL、1mL 规格
- 八联管

#### 【储存条件及有效期】

1. 试剂盒 I 置于 15℃~25℃ 储存，试剂盒 II 置于 -20℃±5℃ 储存，有效期为 6 个月。
2. 试剂盒 II 开封后在 2℃~8℃ 可储存 24 小时，避免反复冻融 5 次以上。
3. 试剂盒 I 常温运输；试剂盒 II 采用泡沫箱加干冰密封运输、运输时间不超过 4 天。
4. 生产日期及有效期至详见产品标签。

#### 【适用仪器】

ABI 7500。

#### 【样本要求】

采样方法：

- 1、取样前在病例信息采集卡上填写个人信息。

2、采集样本最好为晨便。如果无晨便，亦可用其他时间段的粪便，粪便取样量在 1g~15g。

3、拧开 50mL 离心管盖，注意保持垂直，以防保存液倾倒。取样时，按照采样说明书取样。排便后，立即按照采集说明指引方法装入粪便样本保存管内，避免大便与小便混合。

4、将粪便样本装入 50mL 离心管中，按要求使液面升到约 35mL 处，即采样成功。

#### 注意事项：

1、接便时避免尿液、纸巾、污水等非大便样本混入粪便样品中。

2、完成取样后确保拧紧采集管盖子，以防止外泄。

3、避免在肛肠疾病出血期取样；女性避免在生理期间取样。

4、采样前 1 个月内有服用化疗药物的受试者不宜采样。

5、避免采集水样便或痢疾样粪便样本。

#### 保存条件：

常温保存不超过 24 小时；-20℃±5℃冰箱可以保存 3 个月；-70℃及以下冰箱可以保存 12 个月。

#### 【检验方法】

##### 1. 核酸提取

使用安徽达健医学科技有限公司生产的《核酸提取或纯化试剂（离心柱型/粪便）》（备案号：皖芜械备 20220022 号）操作流程见试剂盒说明书，简要步骤如下：

1.1 粪便样本使用混匀仪进行混匀后，4,200rpm 离心 30min，取上清液为粪便脱落细胞悬液；

1.2 取 1mL 粪便脱落细胞悬液，加入 100 μL 胰脂肪酶，充分混匀后 37℃ 消化 20min，4000rpm 离心 10min 取上清；

1.3 取 1mL 上清转移至新的离心管，加入 500 μL 裂解液、60 μL 蛋白酶 K，震荡混匀，70℃ 裂解 40 min；

1.4 加入 500 μl 异丙醇，充分震荡混匀后冰浴静置 10min。

1.5 12000rpm 离心 1min，取上清液加入到吸附柱中，分两次将上清液加入过滤柱吸附离心过柱。

1.6 12000rpm 离心 1-2min 直至残余液体甩干净。加入 800 μl 洗涤液 I，12000rpm 离心 1min，更换外套管。重复一次。

1.7 加入 800 μl 洗涤液 II，12000rpm 离心 1min，更换外套管。重复一次。

1.8 12000rpm 室温离心 2min，将吸附柱放入 1.5ml 无菌离心管中。

1.9 开盖，在抽风柜晾干 5min，以彻底晾干吸附材料中残余的漂洗液。

1.10 加入 60 μl 的洗脱液，室温静置 5-10min，12000rpm 离心 3min，收集 DNA。

注：粪便脱落细胞 DNA 在 -20±5℃ 储存应不超过 30 天。

##### 2. 工作液的制备（在试剂准备区进行）

###### 2.1 20 测试漂洗液的制备

将 9.6mL 无水乙醇加入到漂洗液瓶中，旋紧瓶盖，上下颠倒 5 次，彻底混匀。在瓶侧面的标签上标记好稀释时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“√”。

###### 2.2 50 测试漂洗液的制备

将 24mL 无水乙醇加入到漂洗液瓶中，旋紧瓶盖，上下颠倒 5 次，彻底混匀。在瓶侧面的标签上标记好稀释

时间，签名并在“已加入无水乙醇”的方块“□”内标记“√”。

### 2.3 转化液的配制

首先将转化液离心 30s，然后添加 750 $\mu$ L 纯化和 210 $\mu$ L 缓冲液到转化液中，室温下涡旋振荡 10min，使其充分溶解。制备好的转化液对光很敏感，所以尽量减少在光下的暴露，一管转化液为 10 测试用量，转化液应当在制备后立刻使用，在-20 $^{\circ}$ C $\pm$ 5 $^{\circ}$ C可保存一周。冷冻保存后的转化液，使用前常温下充分溶解振荡离心后使用。

### 3. 亚硫酸氢盐转化（在样本处理区进行）

3.1 预先打开金属浴，37 $^{\circ}$ C恒温。

3.2 室温下解冻并混匀阳性对照品、阴性对照品和待测粪便 DNA 样本。各取 15 $\mu$ L 阳性对照品、阴性对照品和 45 $\mu$ L 待测粪便 DNA 样本（总量建议不高于 2 $\mu$ g）于新的 1.5mL 离心管中。

3.3 每管加入 5 $\mu$ L 缓冲液于步骤 3.2 中的 1.5mL 离心管中，配制成 50 $\mu$ L 体系（阳性对照品及阴性对照品加入 30 $\mu$ L 纯化水），涡旋混匀样本，短暂离心。

3.4 将 3.3 步骤样本置于金属浴 37 $^{\circ}$ C恒温孵育 15min。

3.5 孵育完成后，向每个样本中加入 100 $\mu$ L 预先制备的转化液，混匀并短暂离心。

3.6 金属浴 50 $^{\circ}$ C避光孵育 12~16 小时。

3.7 样本置于冰上（0~4 $^{\circ}$ C）孵育 10min。

3.8 将吸附柱置于收集管中，向吸附柱中加入 400 $\mu$ L 结合液。

3.9 将步骤 3.7 中的样本加入吸附柱中（含有结合液），盖紧管盖上下颠倒混匀数次。

3.10 全速（14000rpm）离心 30s，弃废液。

3.11 向吸附柱中加入 100 $\mu$ L 漂洗液，全速离心 30s，弃废液。

3.12 向吸附柱中加入 200 $\mu$ L 脱磺液，室温（20 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C）孵育 15~20min，之后全速离心 30s，弃废液。

3.13 向吸附柱中加入 200 $\mu$ L 漂洗液，全速离心 30s。重复加入 200 $\mu$ L 漂洗液，全速离心 30s，弃废液及收集管。

3.14 将吸附柱放入 1.5mL 无菌离心管中，向吸附膜的中间部位悬空滴加 30 $\mu$ L 洗脱液，洗脱转化 DNA，全速离心 1min，收集 Bis-DNA。

3.15 获取的 Bis-DNA 应立即用于后续实验，或者-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C保存不超过 3 天。

### 4. PCR 反应设置

#### 4.1 PCR 扩增试剂准备（在试剂准备区进行）

- 从冰箱中取出试剂盒 II，室温下解冻，待完全融化，充分混匀后离心备用。
- 按照表 1 配制 PCR 反应液 1 和 2（每次反应均需要设置阳性对照品和阴性对照品）。

表 1: PCR 反应液

PCR 反应液 1		PCR 反应液 2	
试剂成分	用量/检测次 ( $\mu$ L)	试剂成分	用量/检测次 ( $\mu$ L)
PCR MIX	10	PCR MIX	10
引物探针混合液 I	5	引物探针混合液 II	5
总量/测试	15	总量/测试	15

- 各 PCR 反应液充分混匀后，按每管 15μL 体积分装于 PCR 八联管中，并做好标记后转移至样本处理区。

#### 4.2 加样（在样本处理区进行）

取 5μL 阴性对照品、阳性对照品、待检样本的 Bis-DNA，分别加入到分装好的 PCR 八联管中，盖紧管盖，并短暂离心，将管壁液体离心至管底。

#### 5. PCR 扩增（在 PCR 扩增检测区进行）

5.1 将 PCR 八联管放置在仪器样本槽的相应位置，并记录好摆放次序。

5.2 仪器检测通道选择：Reporter Dye1 (*SDC2/PDX1*): FAM, Quencher Dye1: none; Reporter Dye2 (*NPY*): VIC, Quencher Dye2: none; Reporter Dye3 (*FGF5*): ROX, Quencher Dye3: none; Reporter Dye4 (*GAPDH*): CY5, Quencher Dye4: none; Passive Reference: none。

5.3 对应检测孔的设置：在扩增反应开始前，将待检样本和质控品设定为“Unknown”。

5.4 按表 2 设置 PCR 反应程序：

表 2：PCR 反应程序

荧光程序	温度 (°C)	时间	循环数	荧光信号收集
第一步	95	5 min	1	否
第二步	95	15 s	20	否
	66	30 s		否
第三步	95	10 s	40	否
	58	31 s		是

#### 【阳性判断值】

使用人 *SDC2*、*NPY*、*FGF5*、*PDX1* 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）对临床样本进行 *SDC2*、*NPY*、*FGF5*、*PDX1* 4 基因检测，使用风险值（P 值）计算公式分析靶标基因检测结果 Ct 值（保留整数），获得样本风险值（P 值），再用统计学上的约登指数来确定最合适的灵敏度和特异性所对应的 Cut-off 值，使用 ROC 法进行计算，Cut-off 值为 5.00 时诊断效能最优。即样本检测结果 P 值 ≥ 5.00 时，样本检测结果为阳性；样本检测结果 P 值 < 5.00 时，样本检测结果为阴性。

P 值计算公式 =  $11.11 - 0.0302 * FGF5 \text{ Ct 值} - 0.0427 * NPY \text{ Ct 值} - 0.0811 * PDX1 \text{ Ct 值} - 0.0571 * SDC2 \text{ Ct 值}$

#### 【检测结果的解释】

##### 1. 阈值设定

可按仪器自动输出，也可根据仪器的使用说明手动调整基线，将阈值设定在荧光值对数图的线性部分，从软件中读取 Ct 值。若基因无扩增时，Ct 值定为 40。

##### 2. 试剂盒有效性判定

若试剂盒对照品满足表 3 中所列标准，并且待检样本随同阴性和阳性对照在同一个 PCR 反应中测定，则该 PCR 反应被视为有效。

表 3：试剂盒有效性判定

对照品检测结果	目的基因的 Ct 值	<i>GAPDH</i> 的 Ct 值
---------	------------	---------------------

阳性对照品	扩增曲线呈 S 型, Ct 值 $\leq$ 25	扩增曲线呈 S 型, Ct 值 $\leq$ 25; 或者无扩增曲线
阴性对照品	无扩增曲线或扩增曲线 Ct 值 $>$ 25	扩增曲线呈 S 型, Ct 值 $\leq$ 25

### 3. 样本有效性判定

若内标基因 Ct 值 $\leq$ 25, 且扩增曲线呈 S 型, 则可继续分析。若内标基因 Ct 值 $>$ 25 或无扩增曲线, 但目的基因 Ct 值 $\leq$ 20, 则可继续分析 (可能由于目的基因扩增对内标基因扩增产生抑制); 若内标基因 Ct 值 $>$ 25 或无扩增曲线, 而目的基因无扩增或有扩增但 Ct 值 $>$ 20, 则无法继续分析, 需重复检测。

### 4. 样本检测结果判定

使用 P 值计算公式分析靶标基因检测结果 Ct 值, 获得样本检测结果的 P 值:

- (1) 样本检测结果 P 值 $\geq$ 5.00 时, 样本检测结果为阳性;
- (2) 样本检测结果 P 值 $<$ 5.00 时, 样本检测结果为阴性。

#### 【检测方法的局限性】

1. 本产品仅能检测使用安徽达健医学科技有限公司生产的“一次性使用粪便采集器”收集的粪便样本。
2. 本产品两组基因检测必须联合使用, 以确保结果有效。
3. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应技术训练的技术操作者。
4. 由于大肠癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量, 所以检测结果可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素 (如年龄, 其他疾病) 以及肿瘤级别影响, 样本的采集、制备和存储均应按照要求进行, 否则将影响检查结果, 导致假阴性的检测结果。
5. 本产品检测结果仅供临床参考, 不作为确诊结直肠癌的诊断证据, 任何甲基化检测呈阳性的个体还应接受全结肠镜进一步检查确诊。

#### 【产品性能指标】

##### 1. 产品的性能指标

###### 1.1 阳性符合率

8 份企业阳性参考品 (CRC-P1~CRC-P8) 阳性符合率 (+/+) 为 8/8。

###### 1.2 阴性符合率

3 份企业阴性参考品 (CRC-N1~CRC-N3) 阴性符合率 (-/-) 为 3/3, 内参 GAPDH 基因扩增曲线正常。

###### 1.3 最低检出限

1.3.1 检出限参考品 (CRC-L1~CRC-L8) 结果均为阳性;

1.3.2 使用临床阴性粪便样本为基质, 添加不同比例的人甲基化全基因组 DNA, 进行最低检出限的确认; 对临床肠腺癌、肠神经内分泌癌、肠腺鳞癌、息肉和腺瘤癌患者粪便样本进行不同梯度稀释, 进行最低检出限验证, 结果表明: 试剂盒可在 10ng/ $\mu$ L 基因组背景下检测出不低于 5% 水平的 SDC2/NPY/PDX1/FGF5 基因甲基化。

###### 1.4 精密度

1.4.1 检测 1 份企业阴性精密度参考品, 10 次重复, 同时内参 GAPDH 扩增曲线正常, 结果全部为阴性。

1.4.2 检测 1 份企业弱阳性精密度参考品, 10 次重复, 结果全部为阳性。

1.4.3 检测 1 份企业中阳性精密度参考品, 10 次重复, 结果全部为阳性。计算所测得 SDC2、NPY、FGF5、PDX1 4 基因 Ct 值的变异系数 (CV), 均不应高于 5%。



1.4.4 使用精密度参考品分别对三批试剂盒在 ABI7500 荧光 PCR 仪上由两位实验人员在不同的实验室进行连续 20 天的检测,结果显示在日内、日间、人员间、设备间、实验室间和批间实验结果均符合要求,且中阳性参考品各靶标基因 Ct 值的变异系数 (CV) 小于 5%。

## 2. 其他干扰实验

干扰实验显示,粪便样本中含有以下干扰物:胆红素 (0.20mg/ml)、胆固醇 (5mg/ml),食物残渣中动物 DNA (500ng/ml)、植物 DNA (500ng/ml)、植物油 (10 $\mu$ l/ml) 等,常用口服抗生素如四环素 (10.65mg/ml)、青霉素 (2.56mg/ml) 等,常用胃药吗丁啉 (0.14mg/ml)、胃药斯达舒 (6.84mg/ml)、甘露醇 (75mg/ml)、通便灵胶囊 (7.25mg/ml)、痔疮膏 (24.75mg/ml)、布洛芬胶囊 75 $\mu$ g/ml、奥美拉唑 (2.82mg/ml)、头孢克肟 (20.5mg/ml)、盐酸左氧氟沙星 (0.15mg/ml)、西咪替丁 (2mg/ml) 以及肿瘤治疗药物去氧氟尿苷片 (3 $\mu$ g/ml) 贝伐珠单抗 (2.5mg/ml)、瑞戈非尼 (7.5 $\mu$ g/ml),对检测结果无影响。黄连素 (9.23mg/ml) 对检测结果有影响,因此患者取样前 1 天应注意勿服用药物黄连素。

## 3. 交叉反应

本产品检测转化前的粪便样本、其他甲基化基因阳性的粪便样本、常见肠道微生物 DNA 及食物 DNA、植物油、消化道相关良性病变,均未检测出交叉反应;其他恶性肿瘤粪便样本 (口腔癌、食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆囊癌) 均未检测出交叉反应。

## 4. 准确性

收集 56 例真实临床粪便脱落细胞样本进行准确性研究,分别采用本试剂盒及测序方法进行验证,其中 SDC2 基因的阴性符合率为 96.30%、阳性符合率为 100%; NPY 基因的阴性符合率为 96.43%、阳性符合率为 100%; PDX1 基因的阴性符合率为 96.43%、阳性符合率为 100%; FGF5 基因的阴性符合率和阳性符合率均为 100%。

## 5. 临床有效性

在 3 家临床机构进行临床试验,共纳入 1447 例病例,试验体外诊断试剂与临床参考标准相比,针对结直肠癌患者临床灵敏度为 91.17%、非结直肠癌或癌前病变患者临床特异性为 91.12%。

### 【注意事项】

#### 1. 实验室注意事项

- 1) 应避免实验样本中的交叉污染,包括 DNA 提取、亚硫酸氢盐转化和 DNA 洗涤等过程。
- 2) 为防止在 DNA 提取或转化过程中核酸酶混入样本,建议使用一次性的移液管和枪头,这样可以避免不同样本间的交叉污染,检测实验应该由精通 DNA 提取和荧光定量 PCR 分析的专业实验人员完成。
- 3) 为防止 PCR 扩增产物的污染,建议严格区分 PCR 步骤,分为 DNA 的提取及转化、PCR 试剂的配制和荧光定量 PCR 扩增。

#### 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,不会感染人体或其他动物。待测粪便样本应视为潜在的感染源,其操作应在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感染源的影响。样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器,并与废弃物一起灭菌后方可丢弃;样本操作和处理均需符合相关法规要求:卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废

物管理条例》。

**【参考文献】**

- 1.国家食品药品监督管理总局. 关于发布体外诊断试剂说明书编写指导原则的通告(2014年第17号)[EB/OL]. (2014-09-11)[2023-04-12]. <https://www.nmpa.gov.cn/ylqx/ylqxggtg/ylqxqtgg/20140911120001763.html>.
- 2.Chen W, Zheng R, Baade PD, et al. Cancer statistics in China, 2015[J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2016, 66(2): 115-132.
- 3.Saito Y, Emura F, Matsuda T, et al. A new sinker-assisted endoscopic sub-mucosal dissection for colorectal cancer [J]. Gastrointestinal endoscopy, 2005, 62(2): 297-301.
- 4.Mandel JS, Bond JH, Church TR, et al. Reducing mortality from colorectal cancer by screening for fecal occult blood [J]. New England Journal of Medicine, 1993, 328(19): 1365-1371.
- 5.Levin B, Brooks D, Smith RA, et al. Emerging technologies in screening for colorectal cancer: Ct colonography, immunochemical fecal occult blood tests, and stool screening using molecular markers [J]. CA: a cancer journal for clinicians, 2003, 53(1): 44-55.
- 6.Walsh JME, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: clinical applications [J]. JAMA, 2003, 289(10): 1297-1302.
- 7.Walsh JME, Terdiman JP. Colorectal cancer screening: scientific review [J]. Jama, 2003, 289(10): 1288-1296.
- 8.Church TR. Offering patient's colorectal cancer screening [J]. Journal of the National Cancer Institute, 2005, 97(5): 328-329.
- 9.Atkin WS, Morson BC, Cuzick J. Long-term risk of colorectal cancer after excision of rectosigmoid adenomas [J]. New England Journal of Medicine, 1992, 326(10): 658-662.

**【基本信息】**

注册人/生产企业名称：安徽达健医学科技有限公司

住所/生产地址：：芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房（中科芜湖科技园公司内）

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

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】**