

受理号：CSZ2100221

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：Reprimo/SDC2/TCF4 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.....	5
三、 临床评价概述.....	10
四、 产品受益风险判定.....	12
综合评价意见.....	15

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

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	0.48mlx2
2.引物混合液	引物、探针	0.19mlx1
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 Reprimo、SDC2、TCF4 基因的甲基化水平。

病人外周血中甲基化的 Reprimo、SDC2、TCF4 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需进行胃镜检查，但本身不适合进行胃镜检查或由于个人原因拒绝进行胃镜检查的患者，仅作为胃癌辅助诊断供临床医生参考。

(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 Reprimo、SDC2、TCF4 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。

企业参考品的主要原材料为胃癌早期患者样本、人类基因组 DNA 与细胞系基因组 DNA。其中胃癌早期患者样本 DNA 中 Reprimo、SDC2、TCF4 三个基因对应位点均甲基化，细胞系 DNA 包括 Reprimo、SDC2、TCF4 相应位点单甲基化的三种胃癌细胞系基因组 DNA 和其它癌症 Reprimo、SDC2、TCF4 相应位点无甲基化的细胞系基因组 DNA。阳性参考品 12 个，包括不同浓度水平 Reprimo、SDC2、TCF4 三基因均甲基化的参考品、Reprimo 单甲基化参考品、SDC2 单甲基化参考品和 TCF4 单甲基化参考品。阴性参考品 7 个，包括正常人基因组甲基化阴性参考品、其它消化道癌症基因组甲基化阴性参考品、内源干扰物质阴性参考品和同源序列甲基化参考品。精密度参考品 2 个，包括一定 DNA 浓度的 Reprimo、SDC2、TCF4 三基因均甲基化、甲基化程度高低不同的精密度参考品。检测限参考品 3 个，包括不同背景核酸浓度下，最低可检出甲基化比例的 Reprimo、SDC2、TCF4 三基因甲基化参考品。

(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靶标序列的选择、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、精密度、检测限、分析特异性（交叉反应和干扰研究）的评估及配套使用核酸提取试剂的性能评估。

准确性研究使用临床样本，包括不同分期的胃癌阳性样本，不同 DNA 含量和不同甲基化比例的阳性和阴性样本，试剂盒检测结果与患者临床诊断结果相比较，灵敏度为 85.00%（95%CI: 77.53%-90.30%），特异性为 90.00%（95%CI: 74.38%-96.54%）。

精密度的研究使用临床样本的混合池，对重复性、室内精密度、批间精密度、机型精密度及室间精密度进行了研究。结果表明，试剂盒检测阳性样本及弱阳性样本，Reprimo、SDC2、TCF4 和 ACTB 基因平均 Ct 值的变异系数均低于 5%；检测阴性样本，ACTB 基因平均 Ct 值的变异系数低于 5%。

检测限的研究，在三种适用机型上分别进行了检测限的建

立与验证。结果表明，在 0.05ng/ μ L、0.02ng/ μ L 和 0.01ng/ μ L 血浆游离 DNA 浓度下，试剂盒的检测限分别为 0.06%、0.15% 和 0.29% 的三基因甲基化，约为 18 个拷贝。

交叉反应的研究结果表明，对于非典型性增生的检出情况为：低级别上皮内瘤变的特异性为 66.67%，高级别上皮内瘤变的特异性为 40%。检测其它胃部疾病的特异性为：胃炎 96.67%、胃息肉 96.67%、胃溃疡 93.33%、胃肠间质瘤 100%、胃淋巴瘤 95%。检测其它类型肿瘤样本的特异性为：宫颈癌 86.67%、食管癌 83.33%、结直肠癌 90.00%、肝癌 90.00%、胰腺癌 90.00%、神经内分泌瘤 100%。

干扰研究的结果表明，样本中含有以下浓度的内源干扰物：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，不影响试剂盒检测结果。

对与试剂盒配合使用的血浆游离 DNA 提取和亚硫酸盐转化试剂盒 (京昌械备 20180004) 进行了提取效率、精密度及抗

于扰能力的性能研究，结果表明与市场常用的产品性能相当。

(四) 阳性判断值研究

产品采用三基因拟合 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 Reprimo、SDC2、TCF4 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 基因的平均 Ct 值 \leq 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 \geq 0.6 则判断样本为阳性，样本 P 值 $<$ 0.6 则判断样本为阴性。

阳性判断值研究入组有效病例数 470 例，包括胃癌病人样本 193 例和对照组样本（包括胃炎、胃溃疡、胃息肉、胃部良性肿瘤、食管癌、结直肠癌和肺癌）277 例。对样本数据进行多种方法统计分析，包括 1/3 次 Ct 值、2/3 次 Ct 值、3/3 次 Ct 值、平均 Ct 值、单基因、两基因、三基因、三基因组合及 Δ Ct 值法拟合公式等，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平均 Ct 值拟合 P 值公式法检测准确率最高。使用验证集样本再次验证三基因拟合公式和其它阳性判断值方法，验证研究入组有效病例数 229 例，包括胃癌病人样本 130 例，对照组样本 99 例，结果表明三基因拟合 P 值公式法特异性为 91.92%，灵敏度为 85.38%，总符合率为 88.21%。

(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、使用稳定性及样本稳定性。

长期稳定性：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 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。确定试剂盒于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 存储，有效期为 12 个月。

使用稳定性：试剂盒置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 开瓶放置 6 周、反复冻融 6 次、置于 37°C 3 天后检测产品性能，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。

样本稳定性：使用 EDTA 抗凝管采集全血，建议选用 $2-8^{\circ}\text{C}$ 放置 4 小时以内的新鲜血样分离血浆后用于检测；使用 Cell free DNA 采血管采集全血，建议选用室温放置 6 天以内的新鲜血样分离血浆后用于检测；分离后的血浆样本建议在 -80°C 至 -60°C 下保存 6 个月以内，在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 30 天以内，在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存 12 小时以内进行检测，避免反复冻融；BisDNA 保存期限为在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 4 天以内，在 $2-8^{\circ}\text{C}$ 保存 16 小时以内进行 PCR 检测，仅可冻融一次。

三、临床评价概述

本产品在上海市东方医院、河南省肿瘤医院、山西省肿瘤

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。其中胃癌和其它恶性肿瘤病例采用病理诊断确诊，其它疾病根据相关诊疗指南进行综合诊断确诊。入组病例为胃癌疑似病例，样本类型为血浆。

产品临床灵敏度和特异性评价共纳入临床有效病例 1490 例，其中胃癌病例 468 例（覆盖胃癌所有分期及病理分型），非胃癌的其它病例 1022 例（包括其它易产生干扰的肿瘤及各类良性疾病病例）。临床试验结果显示，本产品临床灵敏度为 80.77%（95%CI: 76.95%，84.08%），特异性为 92.07%（95%CI: 90.26%，93.58%），总符合率为 88.52%（95%CI: 86.81%，90.04%）。上述结果显示试验体外诊断试剂具有良好的临床灵敏度和特异性，满足临床使用需求。

此外，临床试验还纳入 213 例胃癌疑似病例，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 Reprimo 基因，阴性符合率为 99.26%（95%CI: 95.92%，99.87%），阳性符合率为 93.59%（95%CI: 85.86%，97.23%），总符合率为 97.18%（95%CI: 93.99%，98.70%）；针对 SDC2 基因，阴性符合率为 96.92%（95%CI: 92.36%，98.80%），阳性符合率为 95.18%（95%CI: 88.25%，

98.11%), 总符合率为 96.24% (95%CI: 92.76%, 98.08%); 针对 TCF4 基因, 阴性符合率为 96.30%(95%CI: 91.62%, 98.41%), 阳性符合率为 94.87% (95%CI: 87.54%, 97.99%), 总符合率为 95.77% (95%CI: 92.17%, 97.76%)。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 40 例胃癌患者手术前后的样本进行连续检测, 40 例样本术前检测结果均为阳性, 术后检测结果均为阴性, 表明胃癌手术切除后血浆中三基因的甲基化水平降低。

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

申报产品根据 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 Reprimo/SDC2/TCF4 基因甲基化检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 进行产品受益风险判定。

(一) 受益评估

申报产品用于体外检测人外周血血浆中胃癌甲基化基因 Reprimo、SDC2、TCF4 基因的甲基化, 适用于临床需进行胃镜检查, 但本身不适合进行胃镜检查或由于个人原因拒绝进行胃镜检查的患者, 仅作为辅助诊断供临床医生参考, 使病人多了

一种无创性胃癌辅助诊断方法的选择。

(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. 只能用于体外诊断。
2. 该产品的有效性仅针对于 EDTA 抗凝采血管。对于其它血样的收集方式不适用。
3. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应培训的专业技术人员。
4. 由于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. 样本中含有超过以下浓度的干扰物：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)，可能会对检测结果产生影响。

8. 本试剂盒对于非典型性增生有部分阳性检出，其中低级别上皮内瘤变的特异性为 66.67%，高级别上皮内瘤变的特异性为 40%。检测其它胃部疾病的特异性为：胃炎 96.67%、胃息肉 96.67%、胃溃疡 93.33%、胃淋巴瘤 95%。检测其它类型肿瘤样本的特异性为：宫颈癌 86.67%、食管癌 83.33%、结直肠癌 90.00%、肝癌 90.00%、胰腺癌 90.00%。当这类疾病检测结果为阳性时，临床医生需要对上述疾病进行综合考虑。

9. 试剂盒临床试验结果显示对食管癌/食管胃交界部癌有一定检出率 (21.28%)，对结直肠癌有一定检出率 (14.29%)，本产品检测结果为阳性且通过胃镜检查显示无病变的受检者，建议通过其它临床手段排查食管肿瘤、食管胃交界肿瘤及结肠肿瘤。

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。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 4 月 7 日

附件：产品说明书

Reprimo/SDC2/TCF4 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：Reprimo/SDC2/TCF4 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 Reprimo、SDC2、TCF4 基因的甲基化水平。

病人外周血中甲基化的 Reprimo、SDC2、TCF4 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需进行胃镜检查，但本身不适合进行胃镜检查或由于个人原因拒绝进行胃镜检查的患者，仅作为胃癌辅助诊断供临床医生参考。

【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 Reprimo、SDC2、TCF4 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	0.48mlx2
2.引物混合液	引物、探针	0.19mlx1
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

注意不同批次的试剂盒不能混用。

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；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；

- 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（BDVacutainer®，6mL，国械注进 20152222083），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，避免反复冻融，最多可冻融 4 次。在第一次用后，所有试剂在-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 可存储 6 周。生产日期及失效日期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】

血样的收集和保存按以下执行：

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，BDVacutainer®，6mL，国械注进 20152222083），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 Streck 游离 DNA 采血管采集后的血浆可以室温保存 6 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 150rcf。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 150rcf。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。
- 血浆样本可以在-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 下保存不超过 30 天。血浆样本可以在 2~8 $^{\circ}$ C 存放不超过 12 小时。血浆样本仅可冻融 1 次。

3. 亚硫酸盐转化的 DNA (BisDNA) 样本保存

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), 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), 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°C ($50\sim 60^{\circ}\text{C}$) 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 $^{\circ}$ C 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。

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 10 μ l PCR 反应液和 2 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 12 μ l PCR 预反应液加至选定好的 8 联排 PCR 管的孔中。加入 8 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

1) PCR 反应板加载

PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，Reprimo 选取 FAM 荧光通道，SDC2 选取 JOE 荧光通道，TCF4 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) 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 Reprimo、SDC2、TCF4 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

1) PCR 反应板加载

PCR 预反应液中不包含 ROX 或其它染料，Passive Reference 设置必须为“none”，Reprimo 选取 FAM 荧光通道，SDC2 选取 JOE 荧光通道，TCF4 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) 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 Reprimo 和 SDC2 阈值 4000、TCF4 阈值 10000、ACTB 阈值 7000（可视具体状况进行微调）。

2.5 Roche Lightcycler 480 PCR 仪上机

1) PCR 反应板加载

点击设置，双击 Detection Formats 添加荧光通道：Reprimo (465-510nm)、SDC2 (540-580nm)、TCF4 (540-610nm)、ACTB (610-670nm)，如表 1 所示设置反应程序。

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；Reprimo 阈值为 0.6、SDC2、TCF4 阈值为 0.5，ACTB 阈值为 0.2（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 ($P=26.235-0.097*\text{aveCt.Reprimo}-0.154*\text{aveCt.SDC2}-0.332*\text{aveCt.TCF4}$)，计算 P 值及判断阴阳性。

2.7 质量控制方法

试剂盒能够准确进行检测相应 ACTB Ct 值参考范围为 ≤ 35.0 。

每次检测同步对试剂盒内的阴性质控品和阳性质控品进行检测，质控品满足以下性能指标时，证明整个试验流程有效。

阴性质控品：1 份阴性质控品，进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 Reprimo 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 ，TCF4 的 3 次 PCR 反应无 Ct 或平均 Ct > 43.0 ，内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct ≤ 35.0 ，P 值 < 0.6 。

阳性质控品：1 份阳性质控品，进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 Reprimo 的平均 Ct ≤ 37.0 ，SDC2 的平均 Ct ≤ 37.0 ，TCF4 的平均 Ct ≤ 37.0 ，同时内参 ACTB 扩增曲线正常且平均 Ct ≤ 35.0 ，P 值 ≥ 0.6 。

【阳性判断值】

使用 Reprimo/SDC2/TCF4 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 Reprimo、SDC2、TCF4 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 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 0.6 时准确性最优。

反应体系研究表明，产品能够进行准确测量的 ACTB Ct 值参考范围为 ≤ 35.0 。

【检验结果的解释】

对每个样本进行 3 次 PCR 平行测试，计算 Reprimo、SDC2、TCF4 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。

若质控品不满足性能指标，则试验失败，本次结果无效。

在质控品满足性能指标时，根据样本的检测结果判断阴阳性；

阳性结果：待测样本 ACTB 的平均 Ct 值 \leq 35.0，样本 P 值 \geq 0.6 则判断样本为阳性。

阴性结果：待测样本 ACTB 的平均 Ct 值 \leq 35.0，样本 P 值 $<$ 0.6 则判断样本为阴性。

无效结果：如果 ACTB 的平均 Ct 值 $>$ 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】

10. 只能用于体外诊断。

11. 该产品的有效性仅针对于 EDTA 抗凝采血管。对于其它血样的收集方式不适用。

12. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应培训的专业技术人员。

13. 由于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。

14. 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。

15. 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。

16. 样本中含有超过以下浓度的干扰物：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），可能会对检测结果产生影响。

17. 本试剂盒对于非典型性增生有部分阳性检出，其中低级别上皮内瘤变的特异性为 66.67%，高级别上皮内瘤变的特异性为 40%。检测其它胃部疾病的特异性为：胃炎 96.67%、胃息肉 96.67%、胃溃疡 93.33%、胃淋巴瘤 95%。检测其它类型肿瘤样本的特异性为：宫颈癌 86.67%、食管癌 83.33%、结直肠癌 90.00%、肝癌 90.00%、胰腺癌 90.00%。当这类疾病检测结果为阳性时，临床医生需要对上述疾病进行综合考虑。

18. 试剂盒临床试验结果显示对食管癌/食管胃交界部癌有一定检出率（21.28%），对结直肠癌有一定检出率（14.29%），本产品检测结果为阳性且通过胃镜检查显示无病变的受检者，建议通过其它临床手段排查食管肿瘤、食管胃交界肿瘤及结直肠肿瘤。

【产品性能指标】

1. 产品的性能指标

1.1 外观

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

检测 12 份阳性参考品，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 ACTB 平均 $Ct \leq 35.0$ ， P 值 ≥ 0.6 ，符合阳性。

检测 7 份阴性参考品，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 ACTB 平均 $Ct \leq 35.0$ ， P 值 < 0.6 ，符合阴性。

使用临床真实样本，包括不同分期的胃癌阳性样本，不同 DNA 含量和不同甲基化比例的阳性或阴性样本，试剂盒检测结果与患者临床诊断结果相比较，灵敏度为 85.00%，特异性为 90.00%。

1.3 检测限

检测 3 份检测限参考品，每份参考品进行 3 次 PCR 平行测试，结果为 ACTB 平均 $Ct \leq 35.0$ ， P 值 ≥ 0.6 ，符合阳性。

在 0.05ng/ μ L、0.02ng/ μ L 和 0.01ng/ μ L 血浆游离 DNA 浓度下，试剂盒检测 P 值为阳性的检测限分别为 0.06%、0.15% 和 0.29% 的三基因甲基化，约为 18 个拷贝。

1.4 精密度

检测 2 份精密度参考品，每份参考品进行重复 10 次测试，结果为 ACTB $Ct \leq 35.0$ ， P 值 ≥ 0.6 ，符合阳性。同时计算所测得 Reprimo、SDC2、TCF4 和 ACTB 的 Ct 值的变异系数 (CV)，均不高于 5%。

对产品的重复性及室内、三个批次间、三个适用机型间及三个实验室间的精密度研究表明，试剂盒检测阳性样本，Reprimo、SDC2、TCF4 和 ACTB 基因平均 Ct 值的变异系数均低于 5%；检测阴性样本，ACTB 基因平均 Ct 值的变异系数低于 5%。

2. 干扰研究

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)、 K_2EDTA (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

本试剂盒对于非典型性增生的检出情况为：低级别上皮内瘤变的特异性为 66.67%，高级别上皮内瘤变的特异性为 40%。检测其它胃部疾病的特异性为：胃炎 96.67%、胃息肉 96.67%、胃溃疡 93.33%、胃肠间质瘤 100%、胃淋巴瘤 95%。检测其它类型肿瘤样本的特异性为：宫颈癌 86.67%、食管癌 83.33%、结直肠癌 90.00%、肝癌 90.00%、胰腺癌 90.00%、神经内分泌

瘤 100%。

4. 临床试验结果

在 3 家临床试验机构完成临床试验，临床研究共纳入有效样本 1490 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 80.77%，特异性为 92.07%。

【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		医疗器械唯一标识
	向上		易碎
	怕晒		怕雨
	阴性对照		阳性对照

【参考文献】

1. Yosep Chong, Khalilullah Mia-Jan, et al, DNA methylation status of a distinctively different subset of genes is associated with each histologic Lauren classification subtype in early gastric carcinogenesis, Oncol Rep 2014; 31(6): 2535-2544
2. Jung-Hwan Oh, Sung-Hoon Jung, Seung-Jin Hong, Mun-Gan Rhyu, DNA Methylation as Surrogate Marker For Gastric Cancer, J Cancer Prev 2015; 20: 172-178
3. Jae Kyoon Joo, Sang Hyun Kim, et al, CpG Methylation of Transcription Factor 4 in Gastric Carcinoma, Ann Surg Oncol 2010; 17: 3344-3353
4. Carolina Bernal, Francisco Aguayo, et al, Reprimo as a Potential Biomarker for Early Detection in Gastric Cancer, Clin Cancer Res 2008;14(19): 6264-6269
5. Jinfeng Wen, Tuo Zheng, et al, Promoter methylation of tumor-related genes as a potential biomarker using blood samples for gastric cancer detection, Oncotarget 2017; 8(44): 77783-77793

【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：