

受理号：CSZ2100044

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：SDC2和TFPI2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

申请名称：武汉艾米森生命科技有限公司

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.....	17

基本信息

一、申请人名称

武汉艾米森生命科技有限公司

二、申请人住所

武汉东湖新技术开发区高新大道 818 号武汉高科医疗器械园 B 地块一期 B10 栋 1 层 04 号

三、生产地址

武汉东湖新技术开发区高新大道 818 号武汉高科医疗器械园 B 地块三期 B21 栋 2 层 02 号

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

组成	主要组分	规格 (装量×管数)		
		24 测试/盒	48 测试/盒	96 测试/盒
PCR 反应液 I	buffer、dNTP	350 μL×1	700 μL×1	700 μL×2
PCR 反应液II	引物、探针	140 μL×1	280 μL×1	560 μL×1
酶	热启动 Taq 酶	7.6 μL×1	15.2 μL×1	30.4 μL×1
阳性对照	质粒 DNA	40 μL×1	80 μL×1	160 μL×1

具体详见说明书。

(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 SDC2 和 TFPI2 基因的甲基化。

本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。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，必要时仍应建议进行肠镜检查。本产品不能替代肠镜，

不能用于普通人群的肿瘤筛查。

(三) 产品包装规格

24 测试/盒、48 测试/盒、96 测试/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒采用的技术原理是甲基化特异性多重 PCR-荧光探针法。

本产品基于实时荧光 PCR 技术实现对粪便样本中 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化的检测。从人粪便样本中获得肠道脱落细胞基因组 DNA，然后用重亚硫酸盐进行转化，并通过三重 PCR 扩增来测定亚硫酸盐转化后的 DNA (bisDNA)，从而检测发生甲基化的 SDC2 基因 DNA 片段 (ROX 信号通道) 和 TFPI2 基因 DNA 片段 (FAM 信号通道) 以及内控基因 ACTB (VIC 信号通道)。其中 ACTB (β -Actin) 基因为常用管家基因，用于评估检测中样本 DNA 含量和质量，在每一次检测中都同时检测阳性对照和阴性对照。

本试剂盒适用的样本为保存在武汉艾米森生命科技有限公司的细胞保存液中的粪便样本，保存液能有效保护核酸不被降解。粪便样本中特异性核酸提取的原理是利用偶联靶基因探针的磁珠富集相关靶基因。重亚硫酸盐的化学反应把没有发生甲基化的胞嘧啶进行转化，脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐。转化

的原理是亚硫酸盐离子通过亲核反应添加到胞嘧啶上，但是发生了甲基化的胞嘧啶不会被亚硫酸盐转化。本产品对于 SDC2 和 TFPI2 甲基化检测，在 SDC2 和 TFPI2 基因启动子与结直肠癌发生高度相关的 CpG 区域，针对经过重亚硫酸盐转化后的序列分别设计了特异性引物和特异性荧光探针，可以在 PCR 反应中专一地检测出甲基化的序列。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1.主要原材料的选择

该产品的主要原材料包括：引物、探针、Taq 酶和 dNTP，这些原材料均是通过外购的方式获得。

引物和探针均由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰和纯化后获得；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

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测限参考品。

企业参考品的主要原料为粪便样本和细胞系，包括 SDC2 基因相应位点甲基化阳性的细胞系、TFPI2 基因相应位点甲基化阳性的细胞系、SDC2 基因和 TFPI2 基因相应位点甲基化阴性的细胞系。这些细胞系均经过数字 PCR 及 Sanger 测序方法验证。

阳性参考品包括 10 种，分别命名为阳性参考品 P1-P10，其中阳性参考品 P1-P3 为一定 DNA 浓度下含不同比例甲基化 SDC2 基因的单阳样本；P4-P6 为一定 DNA 浓度下含不同比例甲基化 TFPI2 基因的单阳样本；P7-P10 为一定 DNA 浓度下含不同比例甲基化 SDC2 基因和 TFPI2 基因的双阳样本。

阴性参考品包括 10 种，分别命名为阴性参考品 N1-N10。包括添加 SDC2 基因和 TFPI2 基因甲基化阴性细胞系的粪便样本、添加 SDC2 基因和 TFPI2 基因甲基化阴性且其他消化道易共存基因甲基化阳性细胞系的粪便样本、不同干扰疾病患者粪便样本、含一定浓度不同干扰物质的健康人粪便样本。

精密度参考品包括 2 种，命名为精密度参考品 R1 和 R2，为一定 DNA 浓度下含不同比例甲基化 SDC2 基因和 TFPI2 基因的双阳样本。

检测限参考品包括 3 种，分别命名为检测限参考品 L1-L3，其中检测限参考品 L1 为一定 DNA 浓度下含低比例甲基化 SDC2 基因的单阳样本；L2 为一定 DNA 浓度下含低比例甲基化

TFPI2 基因的单阳样本；L3 为一定 DNA 浓度下含低比例甲基化 SDC2 基因和 TFPI2 基因的双阳样本。

本试剂盒设置了阳性对照质控品，为一定浓度的阳性 DNA 样本，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制；此外，每一个反应中均检测内参基因 ACTB，用于结果的判读及监测样本的质量。

（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 酶浓度的确定、dNTP 浓度的确定、PCR buffer 浓度的确定、阳性对照品浓度的确定、单多重体系的验证等；对 PCR 反应条件的研究包括预变性时间、退火温度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；对检测结果的阈值和基线进行了研究。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

该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、不同包装规格性能的研究和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、粪便样本核

酸提取液稳定性、粪便样本核酸转化液稳定性进行了研究。

准确度研究中，申请人分别用三批试剂盒在三种适用机型上对阴性参考品和阳性参考品进行检测，检测结果显示阴性参考品符合率、阳性参考品符合率均为 100%。同时使用若干临床样本对试剂盒准确性进行了研究，结果显示试剂盒检测结果与 Sanger 测序结果一致。

精密度研究中，申请人使用不同浓度和不同甲基化比例的临床样本，分别对三批次试剂盒在三种适用机型上由两位操作者在 20 天进行连续的检测。结果显示试剂盒对临床样本的批内、日内、运行间、批次间、日间、人员间、设备间和实验室间的检测变异系数均小于等于 5%。

分析灵敏度研究中，申请人配制不同浓度、不同甲基化比例的模拟样本，每浓度梯度使用三批试剂盒分别在三种适用机型上检测 20 次，将检出率大于等于 95% 的最低浓度水平确定为最低检测限；检测限的验证为使用连续生产的三批试剂盒在三种适用机型上对最低检测限浓度水平的临床样本检测 20 次。检测结果显示该产品的最低检测限为 1×10^4 copies/ μ L 野生型 DNA 背景下 1% 的 SDC2 和 TFPI2 甲基化 DNA。

分析特异性研究包含交叉反应研究和干扰研究：

交叉反应研究中，用三批试剂盒检测转化前的结直肠癌粪

便样本、非目标的其他结直肠癌相关基因甲基化阳性的粪便样本和常见肠道微生物样本，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，包括胃癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、尿路上皮癌、前列腺癌、宫颈癌、甲状腺癌和肺癌共 10 种恶性肿瘤，结果显示，该产品与胃癌、食管癌、胰腺癌、尿路上皮癌、前列腺癌、宫颈癌存在一定的交叉反应，与其他恶性肿瘤无交叉反应。同时进行了风险分析。

干扰试验结果显示，粪便样本中分别含有以下干扰物：1.07 mg/mL 布洛芬、1.2 mg/mL 黄连素、12 mg/mL 蒙脱石散、0.27 mg/mL 头孢、2 mg/mL 通便灵、0.04 mg/mL 吗丁啉、0.8 mg/mL 氧氟沙星、0.83 mg/mL 开塞露、4 mg/mL 痔疮膏、0.16 mg/mL 奥美拉唑、4 mg/mL 硬脂酸、2 mg/mL 软脂酸、100 µg/mL 动物 DNA、100 µg/mL 植物 DNA、30 mg/mL 甘油三酯、60 mg/mL 血红蛋白、20 mg/mL 胆红素均不干扰本试剂盒的检测结果。

使用三批不同包装规格（24 测试/盒，48 测试/盒，96 测试/盒）的试剂盒进行阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、检测限和精密度研究，结果表明，该产品不同包装规格检测结果性能无差异。

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

该产品阳性判断值的研究采用临床来源粪便样本。474 例样本包括结直肠癌患者样本、进展期腺瘤样本、非进展期腺瘤样本、结直肠息肉样本、结直肠炎症样本、淋巴瘤样本、胃息肉样本、胃炎样本、神经内分泌癌样本、食管癌样本、痔疮样本、其他消化系统良性疾病样本、肠道无异常样本。

采用百分位数法确定内标基因的 Ct 值范围，采用 ROC 曲线法确定靶标基因阳性判断值。内标基因 Ct 值 ≤ 36 时判定为样本合格；在确定样本检测结果有效的情况下，确定了 SDC2 和 TFPI2 基因的 Cutoff 值均为 Ct ≤ 38 。当 SDC2 基因和 TFPI2 基因的 Ct ≤ 38 时判断为对应基因阳性；当 SDC2 基因和 TFPI2 基因的 Ct 值 > 38 或显示 Unde 时判断为对应基因阴性。样本检测结果中，SDC2 基因和 TFPI2 基因任一基因为阳性则样本为阳性，SDC2 基因和 TFPI2 基因同时为阴性则样本为阴性。

(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、开封稳定性、冻融稳定性和运输稳定性。

货架效期稳定性：选择三批次试剂盒置于 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下保存，在效期的第 0、3、6、9、12、13 个月各进行一次检测，

对试剂盒外观、企业参考品及阴/阳性对照品检测的结果显示：试剂盒在生产后保存至 13 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、开封稳定性等分别进行了研究。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

本产品在中国医学科学院北京协和医院、安徽医科大学第一附属医院和武汉大学中南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，样本类型为粪便。产品临床灵敏度和特异度评价共纳入临床有效病例 1438 例，其中结直肠癌病例 364 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 1074 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：本产品的临床灵敏度为 95.3% (95%CI: 94.2% ~ 96.4%)，进展期腺瘤的灵敏度为 63.4% (95%CI: 61.0% ~ 65.9%)，特异度为 90.3% (95%CI: 88.8% ~ 91.8%)。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 500 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，以确认本产品的临床检测性能。试验结果显示：针对 SDC2 基因，阳性符合率为 100%（95%CI: 99.9% ~ 100%），阴性符合率为 99.7%（95%CI: 99.2% ~ 100%），总符合率为 99.8%（95%CI: 99.4% ~ 100%）；针对 TFPI2 基因，阳性符合率为 99.2%（95%CI: 98.4% ~ 100%），阴性符合率为 98.8%（95%CI: 97.8% ~ 99.7%），总符合率为 99.0%（95%CI: 98.1% ~ 99.9%）。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 34 例结直肠癌患者手术前后的样本进行连续检测，30 例样本术前检测结果为阳性，4 例样本术前检测结果为阴性；32 例样本术后检测结果为阴性，2 例样本术后检测结果为阳性；表明结直肠癌患者手术切除后粪便中甲基化水平降低。

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 SDC2 和 TFPI2 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。依据现有临床试验结果，其对结直肠癌的检测灵敏度为 95.3%，对进展期腺瘤的检测灵敏度为 63.4%，特异度为 90.3%。

（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肿瘤早期诊断或确诊的依据，但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、产品忘记装说明书。
- 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，例如使用非推荐的提取试剂、纯化试剂或荧光定量 PCR 仪检测。

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 SDC2 和 TFPI2 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、标志、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规章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 SDC2 和 TFPI2 基因的甲基化。

本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。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，必要时仍应建议进行肠镜检查。本产品不能替代肠镜，不能用于普通人群的肿瘤筛查。

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》（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 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 3 月 11 日

附件：产品说明书

SDC2 和 TFPI2 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：SDC2 和 TFPI2 基因甲基化联合检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

24 测试/盒、48 测试/盒、96 测试/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 SDC2 和 TFPI2 基因的甲基化。

本产品适用于临床医师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，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况判断。

成人每天都会有 10^8 以上的肠上皮细胞从肠壁脱落，并通过大肠蠕动随粪便排出体外，而肿瘤细胞由于增生异常更容易从肠道脱落，因此肠道肿瘤患者的粪便中包含大量的病变细胞及异常的细胞组分，这是粪便检测稳定的物质基础^[1]。研究发现，基因启动子的甲基化修饰是肿瘤发生的早期事件，从结直肠癌患者粪便样本中获得的遗传物质可以更早的反应肠道是否存在癌变情况^[2]。SDC2 是一种细胞表面硫酸乙酰肝素蛋白聚糖，参与调节许多生理过程和病理过程，生理过程包括细胞增殖、

分化、粘附、细胞骨架组织、迁移、伤口愈合、细胞-基质通讯、血管生成；病理过程包括炎症和癌症^[3]。TFPI2 是一种丝氨酸蛋白酶抑制剂^[4]，SDC2 和 TFPI2 基因在结直肠癌组织中的甲基化水平显著高于正常组织^[3,4]。

【检测原理】

本试剂盒采用的技术原理是甲基化特异性多重 PCR-荧光探针法。

本产品基于实时荧光 PCR 技术实现对粪便样本中 SDC2 和 TFPI2 基因甲基化的检测。从人粪便样本中获得肠道脱落细胞基因组 DNA，然后用重亚硫酸盐进行转化，并通过三重 PCR 扩增来测定亚硫酸盐转化后的 DNA (bisDNA)，从而检测发生甲基化的 SDC2 基因 DNA 片段 (ROX 信号通道) 和 TFPI2 基因 DNA 片段 (FAM 信号通道) 以及内控基因 ACTB (VIC 信号通道)。其中 ACTB (β -Actin) 基因为常用管家基因，用于评估检测中样本 DNA 含量和质量，在每一次检测中都同时检测阳性对照和阴性对照。

本试剂盒适用的样本为保存在武汉艾米森生命科技有限公司的细胞保存液中的粪便样本，保存液能有效保护核酸不被降解。粪便样本中特异性核酸提取的原理是利用偶联靶基因探针的磁珠富集相关靶基因。重亚硫酸盐的化学反应把没有发生甲基化的胞嘧啶进行转化，脱氨基反应产生尿嘧啶磺酸盐。转化的原理是亚硫酸盐离子通过亲核反应添加到胞嘧啶上，但是发生了甲基化的胞嘧啶不会被亚硫酸盐转化。本产品对于

SDC2 和 TFPI2 甲基化检测，在 SDC2 和 TFPI2 基因启动子与结直肠癌发生高度相关的 CpG 区域，针对经过重亚硫酸盐转化后的序列分别设计了特异性引物和特异性荧光探针，可以在 PCR 反应中专一地检测出甲基化的序列。

【主要组成成分】

本产品由 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II、酶和阳性对照组成，主要成分如下：

表 1 试剂盒主要组成成分

组成	主要组分	规格（装量×管数）		
		24 测试/盒	48 测试/盒	96 测试/盒
PCR 反应液 I	buffer、dNTP	350 $\mu\text{L}\times 1$	700 $\mu\text{L}\times 1$	700 $\mu\text{L}\times 2$
PCR 反应液 II	引物、探针	140 $\mu\text{L}\times 1$	280 $\mu\text{L}\times 1$	560 $\mu\text{L}\times 1$
酶	热启动 Taq 酶	7.6 $\mu\text{L}\times 1$	15.2 $\mu\text{L}\times 1$	30.4 $\mu\text{L}\times 1$
阳性对照	质粒 DNA	40 $\mu\text{L}\times 1$	80 $\mu\text{L}\times 1$	160 $\mu\text{L}\times 1$

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换使用。

其他需要自备的试剂盒和耗材有：

1. 试剂盒：武汉艾米森生命科技有限公司的细胞保存液（鄂汉械备 20190974 号）、核酸提取试剂（鄂汉械备 20200225 号）和核酸纯化试剂（鄂汉械备 20190973 号或鄂汉械备 20200843 号）；
2. 无 DNase 的纯化水，其与样本一同参与提取和转化过程，作为阴性对

照；

3. 无核酸酶的 EP 管、移液器吸头、PCR 反应管。

【储存条件及有效期】

1. $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ ，避光保存，有效期为 12 个月（请于有效期内使用）。
2. 生产日期和使用期限见标签。
3. 试剂盒冻融次数不得超过 6 次。试剂盒开封后置于 $-20^{\circ}\text{C}\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下保存，不影响有效期。
4. 试剂盒用泡沫箱加冰袋干冰密封运输，运输时间不超过 6 天，运输过程中的温度不高于 -5°C 。

【适用仪器】

ABI 7500，罗氏 LightCycler 480，宏石 SLAN-96P。

【样本要求】

1. 样本的收集和保存

1) 样本的收集：取 5 g~15 g 新鲜的粪便样本，将其放入装有细胞保存液的保存管中，避免液体溅出（建议平行取两份，以备复查）；

2) 取样要求：

- a. 排便习惯大于 1 次/天时，请确保在当天第一次排便时采样；
- b. 粪便样本为水样便时请勿采样；
- c. 女性请避免在生理期采样；
- d. 采样前 24 h 内，请避免食用过度油腻的食物。

- 3) 样本保存: 用细胞保存液保存的样本可在室温下保存和运输, 总时间不应超过 15 天; 若不能及时处理, 可于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 12 个月或 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存 2 年, 冻融次数不超过 5 次。

2. 核酸提取和保存

- 1) 提取: 取 1.8 mL 匀质粪便悬液进行 DNA 提取, 捕获的核酸不适合用 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 来判定核酸质量;
- 2) 保存: 核酸提取液在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 7 天或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 6 个月, 冻融次数不超过 5 次。

3. DNA 重亚硫酸盐修饰

- 1) 转化: 40 μL 核酸提取液全部用来转化, 转化的核酸不适合用 $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ 来判定核酸质量;
- 2) 保存: 转化后 DNA 样本在 $2\text{ }^{\circ}\text{C}\sim 8\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 7 天或 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 6 个月, 冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

进行检测前用户需自行提供无菌、无核酸酶的 EP 管、PCR 专用枪头、纯化水 (阴性对照) 及配套使用的核酸提取试剂、核酸纯化试剂。请将 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II、酶和阳性对照离心后使用。

1. 核酸提取 (在样品处理区操作)

按照推荐的核酸提取试剂说明书对待测粪便样本和与样本等体积的阴性对照进行提取, 获得核酸提取液进行下一步核酸转化处理。

2. 重亚硫酸盐处理（在样品处理区操作）

按照推荐的核酸纯化试剂说明书对核酸提取液（包含阴性对照）进行转化，获得核酸转化液，即可用于 SDC2、TFPI2 基因甲基化检测。

3. PCR 反应液的配制（PCR 反应体系的配制区）

- 1) 每次 PCR 反应中，同时对阴性对照、阳性对照和待测样本进行检测；
- 2) 将 PCR 反应液 I、PCR 反应液 II、酶和阳性对照取出，解冻后，振荡 30 s，瞬时离心 30 s，防止试剂残留在管盖；

3) 反应液配制：

根据扩增用样本数量计算需要分装的反应液管数，如下所示：

反应液管数（N）= 样本数（n）+ 阳性对照（1 管）+ 阴性对照（1 管）

配制反应液：

$N \times (14 \mu\text{L 反应液 I} + 5.7 \mu\text{L PCR 反应液 II} + 0.3 \mu\text{L 酶}) \times 1.1$

4. 分装、加样（在样品处理区进行）

- 1) 分装：将配制的反应液按照 20 μL /管分装至反应管/板中；
- 2) 加样：向已分装好反应液的各反应管/板分别按顺序依次加入处理好的阴性对照 NC、样本核酸转化液、阳性对照 PC 各 5 μL 。加样后，确定盖好管盖或封膜后，短暂离心 30 s（避免有气泡，如果有气泡，用手指轻弹，重新瞬时离心），立即进行 PCR 扩增反应。

注意：阳性对照含有高浓度的目标 DNA，同时任何一个样本均有可能为阳性样本，为避免样本间的污染，请务必小心操作。

5. PCR 扩增（PCR 扩增及结果分析区）

1) 各检测管所选用的荧光通道设置如下：

表 2 各靶基因检测荧光通道

基因	信号通道	淬灭基团
SDC2	ROX	NONE
TFPI2	FAM	NONE
ACTB	VIC	NONE

2) 按照表 3 设置 PCR 扩增程序并运行。

表 3 PCR 扩增程序

步骤		温度	时间	循环数	荧光收集
1	预变性	95 °C	5 min	1	否
2	变性	95 °C	15 s	45	
3	退火延伸	60 °C	30 s		是

6. 试验结果读取

使用仪器配套软件对数据进行读取、分析。

6.1 ABI7500 机型结果读取

1) 基线设置：手动设置 6~20；

2) 荧光阈值设置：手动设置，一般设定在 PCR 扩增的指数期，一般为扩增曲线升起的拐点处；

3) Ct 值确定：设定基线及荧光阈值后，阈值线与扩增曲线的交点为 Ct

值。

6.2 LightCycler 480 机型结果读取

PCR 扩增程序结束后，在菜单栏点击“Analysis”-“Abs/Fit points”，后续基线、荧光阈值和 Ct 值的设置同 ABI7500 机型。

6.3 SLAN-96P 机型结果读取

PCR 扩增程序结束后，在菜单栏点击“常用选项”-扩增曲线-绝对荧光值法-页面下方的确定-菜单栏“分析”。后续基线、荧光阈值和 Ct 值的设置同 ABI7500 机型。

7. 质量控制

7.1 阴性、阳性对照

本试剂盒中阴性对照、阳性对照各通道检测信号 Ct 值应符合表 4 要求：

表 4 阴性、阳性对照检测信号 Ct 值要求

对照名称	信号通道	基因	扩增结果
阳性对照	ROX	SDC2	$26 \leq Ct \leq 30$
	FAM	TFPI2	$26 \leq Ct \leq 30$
	VIC	ACTB	$26 \leq Ct \leq 30$
阴性对照	ROX	SDC2	Unde 或 $Ct \geq 40$
	FAM	TFPI2	Unde 或 $Ct \geq 40$
	VIC	ACTB	Unde 或 $Ct \geq 40$

注：1)ABI7500 上无扩增时显示为 Undetermined，简写为 Unde，SLAN-96P

上无扩增时显示为 no Ct，LightCycler 480 无扩增时显示空白。

2) 阴性、阳性对照 Ct 值合格之后方可对待测样本结果进行判定。

7.2 内控

本试剂盒中含有内控基因 ACTB，待测样本内控 Ct 值 ≤ 36 则样本有效，否则判定样本无效。

【阳性判断值】

阴性对照、阳性对照和内控合格之后，则可按照表 5 和表 6 对样本检测结果进行判定。

表 5 基因检测结果判定

基因	信号通道	Ct 值	基因检测结果判定
SDC2	ROX	$Ct_{ROX} \leq 38$	SDC2 甲基化阳性
		$Ct_{ROX} > 38$ 或 Unde	SDC2 甲基化阴性
TFPI2	FAM	$Ct_{FAM} \leq 38$	TFPI2 甲基化阳性
		$Ct_{FAM} > 38$ 或 Unde	TFPI2 甲基化阴性

表 6 样本检测结果判定

基因甲基化	样本检测结果判定
SDC2 阳性 TFPI2 阳性	阳性
SDC2 阳性 TFPI2 阴性	
SDC2 阴性 TFPI2 阳性	

SDC2 阴性 TFPI2 阴性	阴性
------------------	----

采用 ROC 曲线法确定靶标基因阳性判断值,采用百分位数法确定内标基因的 Ct 值范围。用本试剂盒对 474 例临床粪便样本进行检测,样本包括结直肠癌、进展期腺瘤、非进展期腺瘤、结直肠息肉、结直肠炎症、淋巴瘤、胃息肉、胃炎、神经内分泌癌、食管癌、痔疮和肠道无异常等。

使用试剂盒检测 276 例临床粪便样本进行阳性判断值验证,样本包括结直肠癌、进展期腺瘤、非进展期腺瘤、结直肠息肉、结直肠炎症、憩室、胃癌、胃息肉、胃炎、痔疮和肠道无异常等。检测结果表明,试剂盒对结直肠癌的灵敏度为 95.5%,对进展期腺瘤的检出率为 57.1%,特异度为 91.7%,总符合率为 92.0%。

【检测结果的解释】

1. 若样本检测结果为阳性,表示受检者取样时患有结直肠癌或癌前病变的风险较高,建议进行肠镜等其他检查以确诊。
2. 若样本检测结果为阴性,表示受检者取样时患有结直肠癌或癌前病变的风险较低,但并不能完全排除疾病风险,必要时仍应建议进行肠镜检查。
3. 若阴性对照各通道信号 Ct 值超出表 5 的范围,则可能是由于环境或试剂被污染所致,此次结果无效,应重新换一个环境进行检测或对环境进行处理,消除污染后重新检测。
4. 若阳性对照各通道信号 Ct 值超出表 5 的范围,则表明该试剂盒失效,

需更换试剂盒重新检测。

5. 若样本内控无信号，但是目的基因信号正常，说明反应体系中内控信号可能被抑制，建议重新进行 PCR 检测或重新提取、转化 DNA 后检测。
6. 若样本内控信号有扩增，但 Ct 值 >36 ，说明反应体系中 DNA 量不足，建议重新提取、转化 DNA 后检测或重新取样后检测。
7. 若样本内控信号及检测信号都不升起则表明此反应孔漏加 DNA 或样本不合格，此样本应重新检测或重新取样后检测。

【检测方法的局限性】

1. 本检测试剂盒需配套使用武汉艾米森生命科技有限公司的细胞保存液，核酸提取试剂以及核酸纯化试剂。
2. 样本应该为新鲜的粪便样本，取样后需及时保存到细胞保存液中。
3. 检测结果仅供临床参考，不作为确诊或排除结直肠癌的唯一依据，为达到诊断目的，此检测结果要与临床检查、病史和其他的检查结果结合使用，检测结果阳性时，建议进行结肠镜检查。
4. 检测结果为阴性时，也不能完全排除患结直肠癌的可能。样本中肿瘤细胞过少，样本处理不当造成的核酸降解都可能造成假阴性的结果。
5. 不合理的样本采集、转运及处理、以及不当的实验操作和实验环境均有可能影响检测结果。

【产品性能指标】

1. 外观

组分齐全、包装外观清洁、无泄漏、无破损；标志、标签字迹清楚。

2. 准确度

2.1 阴性符合率

检测 10 份阴性参考品，检测结果均为阴性，阴性符合率为 100%；

检测 Sanger 测序结果为阴性的临床样本（包括肠道无异常、结直肠息肉、肠炎、胃息肉、胃炎、混合痔），检测结果均为阴性。

2.2 阳性符合率

检测 10 份阳性参考品，检测结果均为阳性，阳性符合率为 100%；

检测 Sanger 测序结果为阳性的结直肠癌和进展期腺瘤样本，检测结果均为阳性。

3. 最低检测限

检测限参考品（核酸浓度 1×10^4 copies/ μ L，甲基化比例 1%）重复检测 20 次，阳性检出率 $\geq 95\%$ 。

4. 精密度

安排两位操作者分别在不同的实验室、使用不同仪器，每天分别用 3 批试剂盒对阴性参考品和低、高浓度的阳性参考品以及阴性临床样本和低、高浓度的阳性临床样本进行检测，连续进行 20 天。结果表明本试剂盒批间、日间、人间、仪器间、实验室间精密度 Ct 值的变异系数均不大于 5%。

5. 特异性

用三批试剂盒检测转化前的结直肠癌粪便样本、非目标的其他结直肠癌相关基因甲基化阳性的粪便样本和常见肠道微生物样本，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（包括胃癌、食管癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌、尿路上皮癌、前列腺癌、宫颈癌、甲状腺癌和肺癌共 10 种恶性肿瘤患者样本），结果显示：该产品与胃癌、食管癌、胰腺癌、尿路上皮癌、前列腺癌、宫颈癌存在一定的交叉反应，与其他恶性肿瘤无交叉反应。

6. 干扰物质

干扰实验显示，样本中分别含有以下干扰物：1.07 mg/mL 布洛芬、1.2 mg/mL 黄连素、12 mg/mL 蒙脱石散、0.27 mg/mL 头孢、2 mg/mL 通便灵、0.04 mg/mL 吗丁啉、0.8 mg/mL 氧氟沙星、0.83 mg/mL 开塞露、4 mg/mL 痔疮膏、0.16 mg/mL 奥美拉唑、4 mg/mL 硬脂酸、2 mg/mL 软脂酸、100 µg/mL 动物 DNA、100 µg/mL 植物 DNA、30 mg/mL 甘油三酯、60 mg/mL 血红蛋白、20 mg/mL 胆红素对检测结果均无影响。

7. 临床研究

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 1438 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 95.3%，进展期腺瘤的检出率为 63.4%，特异度为 90.3%。

【注意事项】

1. 实验过程中使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
2. 体系配制应在超净工作台中配制，样本处理应在生物安全柜或者通风橱（负压式）或防污染罩的实验条件下进行，以防止对环境污染。
3. 每次实验应设置阴、阳性对照。试剂使用前应在常温下充分融化并混匀，PCR 反应液II应避光保存。
4. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。
5. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应定期用 0.5%次氯酸钠或 75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
6. 实验中接触过对照品和样本的废弃物品（如吸头）、扩增完毕的离心管、样本等应进行无害化处理后方可丢弃。
7. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。
8. 实验前请仔细阅读说明书，并严格按照说明书要求进行实验。
9. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194 号或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。
10. 样本的处理和检测样本的容器、检验过程中使用的材料的处理要符合《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》，以及国家、地区的相关要求。

【标识的解释】

试剂盒标签用图形符号	说明
	体外诊断试剂
	使用前阅读说明书
	温度限制

【参考文献】

1. Ahlquist DA1, Zou H, Domanico M, Mahoney DW, Yab TC, *et al.* Next-generation stool DNA test accurately detects colorectal cancer and large adenomas. *Gastroenterology*. 2012;142(2):248-256.
2. Thomas F. Imperiale, M.D., David F. Ransohoff, M.D *et al.* Multitarget Stool DNA Testing for Colorectal-Cancer Screening. *N Engl J Med* 2014; 370:1287-1297.
3. Tae Jeong Oh, Hyun Il Oh, *et.al.* Feasibility of quantifying SDC2 methylation in stool DNA for early detection of colorectal cancer. *Clinical Epigenetics* (2017) 9:126.
4. Sabine C.G., Mashaal D, Joo M.Y, Kelly E,*et.al.* Methylation of TFPI2 in Stool DNA: A Potential Novel Biomarker for the Detection of Colorectal Cancer.. *Cancer Res*. 2009 June 1; 69(11): 4691–4699.

【基本信息】

注册人/生产企业名称/售后服务单位名称：武汉艾米森生命科技有限公司

住 所：武汉东湖新技术开发区高新大道 818 号武汉高科医疗器械园 B 地块一期 B10 栋 1 层 04 号

联系电话：400-1024-253

生产地址：武汉东湖新技术开发区高新大道 818 号武汉高科医疗器械园

B 地块三期 B21 栋 2 层 02 号

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】