

受理号: CSZ2300079

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称: MT-1A、Epo 及 Septin9 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: 博尔诚 (北京) 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 .....	11
四、产品受益风险判定 .....	13
综合评价意见 .....	15

## 基本信息

### 一、申请人名称

博尔诚（北京）科技有限公司

### 二、申请人住所

北京市北京经济技术开发区宏达南路 18 号院 3 号楼 10 层

### 三、生产地址

北京市北京经济技术开发区宏达南路 18 号院 4 号楼 3 层、  
2 号楼 501-504 室、1 幢-1 层-101 A 区和 B 区

## 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：

试剂	主要成分	规格/数量
PCR 反应液	dNTPs、PCR Buffer、引物、探针和阻断序列	840 $\mu$ L×1 管
聚合酶	Taq DNA 聚合酶	45 $\mu$ L×1 管
阴性对照品	WBC DNA	2.1mL×3 管
阳性对照品	HeLa DNA、WBC DNA	2.1mL×3 管

#### (二) 产品预期用途

该试剂盒用于体外定性检测人血浆中甲基化的 MT-1A、Epo 及 Septin9 基因。

该产品临床预期用于临床诊断建议进行食管镜检查同时因依从性差或身体条件不适合而暂时不能进行内镜检查的患者，相关病例应有食管癌相关症状、体征，如吞咽食物时有哽咽感、异物感、胸骨后疼痛或出现明显的吞咽困难，食管造影发现食管黏膜局限性增粗、局部管壁僵硬、充盈缺损或龛影等表现等。

该产品不能替代食管镜检查，检查结果阳性不能确认病例为食管癌患者，检查结果阴性亦不能排除食管癌患者。该产品适用于食管癌的辅助诊断，不用于普通人群的肿瘤筛查。

根据《食管癌诊疗规范》，食管癌的高危因素为年龄 40 岁以上，长期饮酒吸烟、直系家属有食管癌或恶性肿瘤病史、具有上述癌前疾病或癌前病变者。早期食管癌的症状一般不明显，常表现为反复出现的吞咽食物时有异物感或哽咽感，或胸骨后疼痛。MT-1A 基因是金属硫蛋白基因的一员，参与细胞增殖、分化和凋亡等，MT-1A 基因的异常表达在多种人类肿瘤均有发现；人类 Epo 基因位于 7 号染色体长 22 区，通过表达 Epo 蛋白，发挥抗凋亡并维持细胞存活的作用；Septin9 是 Septin 基因家族的一个成员，该基因家族至少有 13 个基因组成，它们编码保守的 GTPase 结构域，可以结合细胞骨架相关的蛋白质，和细胞分裂与肿瘤发生相关。研究发现，在食管癌患者血浆样本中甲基化的 MT-1A、Epo 及 Septin9 基因含量特征性增高。

### （三）产品包装规格

30 人份/盒。

### （四）产品检验原理

MT-1A、Epo 及 Septin9 基因甲基化检测试剂盒（PCR 荧光探针法）包括两个步骤。步骤 1，使用血浆处理试剂提取血浆中的游离 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磷酸盐，发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化；步骤 2，亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）做四重

PCR 扩增, PCR 反应中的阻断序列和探针能区分甲基化和非甲基化序列, 甲基化序列会得到扩增, 与甲基化 MT-1A 基因、Epo 基因和 Septin9 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。内对照 ACTB (β-actin) 基因用于评估检测中 DNA 量是否足够。试剂盒中提供了阳性和阴性对照, 两者在每一次检测中都需要同时加入。

## 二、临床前研究概述

### (一) 主要原材料

#### 1. 主要原材料的选择

主要原材料包括聚合酶、PCR 反应液、引物探针和阻断序列干粉、人白细胞基因组 DNA 和 HeLa 细胞基因组 DNA。这些原料均是通过外购的方式获得。

其中引物探针和阻断序列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、配制获得; 聚合酶由原材料供应商克隆表达后获得; 人白细胞基因组 DNA 和 HeLa 细胞基因组 DNA 由供应商培养、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

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出限参考品。

企业参考品的主要原材料为临床样本、人白细胞基因组 DNA 与细胞系基因组 DNA。其中临床样本包括中 MT-1A、Epo、Septin9 三个基因对应位点甲基化和未甲基化的样本以及其他其他易共存基因位点甲基化的样本，细胞系基因组 DNA 包括 MT-1A、Epo、Septin9 相应位点均甲基化、单甲基化和均未甲基化的五种食管癌细胞系基因组 DNA。所有样本均采用一代测序进行确认，各项企业参考品综合用于产品性能检测，包含阳性符合率、阴性符合率、检出限、精密度评价。

阳性参考品包括不同浓度水平和不同甲基化水平 MT-1A、Epo、Septin9 三基因均甲基化的参考品；MT-1A 单甲基化参考品、Epo 单甲基化参考品和 Septin9 单甲基化参考品；MT-1A 和 Epo 均甲基化参考品、Epo 和 Septin9 均甲基化参考品。阴性参考品包括人基因组 DNA 未甲基化阴性参考品、其它癌症基因甲基化但 MT-1A、Epo、Septin9 未甲基化阴性参考品、内源干扰物质阴性参考品等。精密度参考品包括不同 DNA 浓度和甲基化水平的 MT-1A、Epo、Septin9 三基因均甲基化的精密度参考品。最低检出限参考品包括最低可检出甲基化比例和浓度的 MT-1A、

Epo、Septin9 不同甲基化水平参考品。

## （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包括靶标序列的选择、引物探针阻断序列浓度的确定、聚合酶用量的确定、PCR 反应液的选择、阴/阳性对照品配方的确定研究；对 PCR 过程中的预变性时间、退火延伸温度等反应参数研究；确定样本的用量以及样本保存时间的研究；对该产品两种适用机型宏石 PCR 分析系统 SLAN-96S、Applied Biosystems 7500 的反应程序及分析条件进行的研究。通过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

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。

在准确度研究中，在两种适用机型上分别检测不同 DNA 含量、不同甲基化水平的阳性和阴性样本，通过参比方法对样本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%。

在精密度研究中，使用临床样本，对批内精密度、日间精

密度、批间精密度、不同机型间精密度、不同操作者之间的精密度及室间精密度等进行了综合评价。研究结果显示试剂盒的检测结果在两种适用机型上批内精密度、日间精密度、批间精密度、不同机型间精密度、不同操作者之间的精密度及室间精密度均符合要求。阳性样本和阴性样本计算相关检测值的变异系数 (CV)，均不高于 5%。

在检出限研究中，在两种适用机型上分别进行了检出限的建立与验证。结果表明，试剂盒的检出限为 6copies/ $\mu$ L 野生型 DNA 背景下 0.75% 的 MT-1A、Epo 以及 Septin9 三基因甲基化。

分析特异性研究包括交叉反应研究和干扰研究。

交叉反应的研究结果表明，常见的其他甲基化基因对检测结果无影响；检测食管良性疾病的特异性大于 90%；检测其他肿瘤（胰腺癌、乳腺癌、宫颈癌、子宫内膜癌、肺癌、肠癌、胃癌）总体特异性大于 80%。对扩增产物的 SNP 分析研究显示，人群中的 SNP 位点对检测结果无影响。

干扰研究的结果表明，样本中含有以下浓度的内源及外源干扰物：胆红素 (0.2mg/mL)、胆固醇 (5mg/mL)、葡萄糖 (10mg/mL)、血红素 (10mg/mL)、人血清白蛋白 (40mg/mL)、甘油三酯 (12mg/mL)、尿酸 (0.235 mg/mL)、K<sub>2</sub>EDTA (20mg/mL)、红血球 (0.4% v/v)、未甲基化基因组 DNA (35ng/mL)、维生

素 C (0.15mg/mL)、双氢氯噻嗪 (0.05mg/mL)、阿托伐他汀钙片 (0.04mg/mL)、阿司匹林 (4.00mg/mL)、盐酸二甲双胍片 (1.00mg/mL)、奥美拉唑 (0.06mg/mL)、头孢曲松钠 (2.00mg/mL)、对乙酰胺基酚 (1.00mg/mL)、阿莫西林 (2.00mg/mL)、甲硝锉 (1.80mg/mL) 对检测结果无影响。

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 (京经械备 20140053 号) 与商业化试剂盒进行了提取效果、转化效果的性能及选择研究, 结果表明配套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

阳性判断值研究分为建立和验证两部分, 共入组有效病例数 798 例, 包括食管癌样本 330 例, 食管良性疾病 312 例, 其他癌症样本 156 例 (肠癌、胃癌、肺癌等)。阳性判断值建立是通过 ROC 曲线分析并比较不同 Cutoff 值下组合检测的诊断性能确定三基因联合判定方法和相应的阳性判断值。然后采用独立验证集对阳性判断值进行验证, 最终确定产品的阳性判断值为: MT-1A Ct 值  $\leq 37.5$  时 MT-1A 为阳性, MT-1A Ct 值  $> 37.5$  则为阴性; Epo Ct 值  $\leq 37.5$  时, Epo 为阳性, Epo Ct 值  $> 37.5$  则为阴性; Septin9 Ct 值  $\leq 43.0$  时, Septin9 为阳性, Septin9 Ct 值  $> 43.0$  则为阴性。如果样本中 MT-1A、Epo、Septin9 中有

一个、两个或三个检测为阳性，则判定该样本测试结果为阳性。

### （五）稳定性研究

申请人对该产品的长期稳定性、使用稳定性、运输稳定性及样本稳定性等进行了研究。

长期稳定性：三批次试剂盒置于-25~-15°C冰箱中保存，在储存后的第0、6、9、12、13、14个月进行检测，结果显示产品在生产后14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-25~-15°C存储，有效期为12个月。

## 三、临床评价概述

申请人在中国医学科学院肿瘤医院、中国人民解放军空军军医大学第一附属医院、中国人民解放军空军军医大学第二附属医院、河南省肿瘤医院、西安交通大学第二附属医院、汕头大学医学院附属肿瘤医院共六家临床机构完成了临床试验。采用试验用体外诊断试剂与食管癌临床参考标准进行比较研究，对产品临床性能进行评价。入组病例包括：有食管癌相关症状、体征的受试者，如吞咽食物时有哽咽感、异物感、胸骨后疼痛或出现明显的吞咽困难，食管造影发现食管黏膜局限性增粗、局部管壁僵硬、充盈缺损或龛影等表现等。样本类型为血浆样本。临床试验共入组受试者954例，其中临床参考方法确认食管癌病例641例，非食管癌病例313例；临床确诊为食管癌的

病例中包括鳞状细胞癌 552 例，腺癌、复合性小细胞-腺癌、神经内分泌肿瘤、淋巴上皮瘤样癌、粘液表皮样癌等共计 89 例；入组病例包括 I 期病例 106 例、II 期病例 111 例、III 期病例 204 例，IV 期病例 117 例、分期不明病例 70 例；非食管癌包括食管良性疾病 268 例。临床试验还入组胃癌 70 例、结直肠癌 51 例、乳腺癌 30 例、肺癌 28 例、肝癌 19 例。试验结果显示，本产品与临床参考标准相比，临床灵敏度为 85.5% (95%CI: 82.8%, 88.2%)，临床特异度为 93.6% (95%CI: 90.3%, 96.1%)。

此外，临床试验还纳入 239 例疑似食管癌病例，采用试验体外诊断试剂与一代测序方法进行比较研究，确认本产品的临床检测性能。试验结果显示：针对 MT-1A 基因，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 99.4%，总符合率为 99.6%；针对 Epo 基因，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 98.7%，总符合率为 99.2%；针对 Septin9 基因，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 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。

另外，采用试验体外诊断试剂对 32 例食管癌患者手术前后的样本进行连续检测，30 例患者术前检测结果为阳性，术后检测结果为阴性；1 例患者术前术后检测结果均为阴性；1 例患者术前检测结果为阳性，术后检测结果均为阳性。表明食管癌手

术切除后血浆中甲基化水平降低。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求。

## 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 MT-1A、Epo 及 Septin9 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

食管癌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，我国食管癌的死亡率排名第五。早期食管癌常常发病隐匿，可无明显的临床症状。甲基化出现在癌症超早期，是癌症致病因素。使用 qPCR 平台，体外定性检测人血浆中甲基化的 MT-1A、Epo 及 Septin9 基因，是食管癌辅助诊断的有效实施方式之一。该试剂盒适用于临床医师建议做食管内镜检测，但因病人依从性差或其它医学原因无法做食管内镜检测患者的辅助诊断，为病人提供了一种无创性诊断方式的选择，可用于食管癌的高风险人群检测，检测结果供临床医师参考。

### （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. 本试剂盒不包含血浆处理及亚硫酸盐转化试剂，应使用博尔诚（北京）科技有限公司生产的核酸提取试剂。
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. 由于食管癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响。样本的收集请严格按照【样本要求】中的要求进行，否则将影响检测结果。
5. 本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床确诊的依据，应结合其他临床诊断结果进行判定。判断为阳性的患者，建议根据医生建议进一步检查以便确诊，判断为阴性的患者不排除患病的可能。

## 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7月30日

附件: 产品说明书

## MT-1A、Epo 及 Septin9 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：MT-1A、Epo 及 Septin9 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血浆中甲基化的 MT-1A、Epo 及 Septin9 基因。

该产品临床预期用于临床诊断建议进行食管镜检查同时因依从性差或身体条件不适合而暂时不能进行内镜检查的患者，相关病例应有食管癌相关症状、体征，如吞咽食物时有哽咽感、异物感、胸骨后疼痛或出现明显的吞咽困难，食管造影发现食管黏膜局限性增粗、局部管壁僵硬、充盈缺损或龛影等表现等。该产品不能替代食管镜检查，检查结果阳性不能确认病例为食管癌患者，检查结果阴性亦不能排除食管癌患者。该产品适用于食管癌的辅助诊断，不用于普通人群的肿瘤筛查。

根据《食管癌诊疗规范（2018 年版）》，食管癌的高危因素为年龄 40 岁以上，长期饮酒吸烟、直系家属有食管癌或恶性肿瘤病史、具有上述癌前疾病或癌前病变者。早期食管癌的症状一般不明显，常表现为反复出现的吞咽食物时有异物感或哽咽感，或胸骨后疼痛。MT-1A 基因是金属硫蛋白基因的一员，参与细胞增殖、分化和凋亡等，MT-1A 基因的异常表达在多种人类肿瘤均有发现；人类 Epo 基因位于 7 号染色体长 22 区，通过表达 Epo 蛋白，发挥抗凋亡并维持细胞存活的作用；Septin9 是 Septin 基因家族的一个成员，该基因家族至少有 13 个基因组成，它们编码保守的 GTPase 结构域，可以结合细胞骨架相关的蛋白质，和细胞分裂与肿瘤发生相关。研究发现，在食管癌患者血浆样本中甲基化的 MT-1A、Epo 及 Septin9 基因含量特征性增高。

### 【检验原理】

MT-1A、Epo 及 Septin9 基因甲基化检测试剂盒（PCR 荧光探针法）包括两个步骤。步骤 1，使用血浆处理试剂提取血浆中的游离 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磷酸盐，发生甲基化的胞嘧啶则不会被亚硫酸盐转化；步骤 2，亚硫酸盐转化的 DNA（BisDNA）做四重 PCR 扩增，PCR 反应中的阻断序列和探针能区分甲基化和非甲基化序列，甲基化序列会得到扩增，与甲基化 MT-1A 基因、Epo 基因和 Septin9 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。内对照 ACTB（β-actin）基因用于评估检测中 DNA 量是否足够。试剂盒中提供了阳性和阴性对照，两者在每一次检测中都需要同时加入。

### 【主要组成成分】

试剂	主要成分	规格/数量
PCR 反应液	dNTPs、PCR Buffer、引物、探针和阻断序列	840μL×1 管

聚合酶	Taq DNA 聚合酶	45 $\mu$ L $\times$ 1 管
阴性对照品	WBC DNA	2.1mL $\times$ 3 管
阳性对照品	HeLa DNA、WBC DNA	2.1mL $\times$ 3 管

以下试剂和耗材是本试剂盒不包含，但对该实验必需的：

- 1) 血浆游离 DNA 提取和亚硫酸盐转化试剂盒（试剂盒名称：核酸提取试剂；备案号：京经械备 20140053 号；公司名称：博尔诚（北京）科技有限公司）；
- 2) 无水乙醇（分子生物级别，浓度高于 99.5%）；
- 3) 15 mL 聚丙烯离心管带有圆锥型底，无菌；
- 4) 2.0 mL 离心管，圆底带有联体螺旋型的密封盖；
- 5) 带有过滤装置的吸头，包括 2-100 $\mu$ L、50-1000 $\mu$ L 规格；
- 6) 存储 DNA 的 96 孔板；包括 0.1mL、0.2mL 规格；
- 7) 96 孔板密封膜；
- 8) 96 孔板密封膜的手动压膜器；
- 9) 可再封闭型塑料袋；10 $\times$ 15 cm；
- 10) 可竖立的 5mL 密封冻存管；
- 11) BD Vacutainer<sup>®</sup> K<sub>2</sub>EDTA 6mL 采血管
- 12) 一次性移液器，可以非无菌包装，长度 15cm，体干直径 5mm，能吸取 5mL 液体。

#### 【储存条件及有效期】

试剂盒有效期为 12 个月。请勿使用过期的试剂。不同批次的试剂盒不能混用。

每一管 PCR 反应液开封后可在-25~15℃保存 2 个月，冻融次数不超过两次，使用两次后剩余的残液应丢弃。

试剂盒于-25~15℃条件下存储。可使用干冰或冷链-25~15℃进行运输，不超过 7 天。

生产日期及失效日期详见产品标签。

#### 【适用仪器】

1. Applied Biosystems 7500 实时荧光定量 PCR 仪（Life Technologies Holdings Pte Ltd）
2. SLAN-96S 全自动医用 PCR 分析系统（上海宏石医疗科技有限公司）

#### 【样本要求】

试剂盒的检测对象为亚硫酸盐处理后的 DNA，外周血的制备及血浆游离 DNA 的提取建议

参照如下方式执行：

##### 1. 全血采集

- 采血量：5 mL。
- 采血方法：使用 K<sub>2</sub>EDTA 抗凝采血管(BD Vacutainer<sup>®</sup> K<sub>2</sub>EDTA 6mL 采血管)采血。
- 采集后的血样应立即离心制备血浆，如不能及时处理，应放入 2~8℃冰箱，且在 2~8℃温

度下保存的时间不超过 8 小时，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  $1350\pm 150\text{rcf}$ 。从离心机中取出采血管，用一个干净的 15cm 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  $1350\pm 150\text{rcf}$ 。用新的 1 次性移液管或者血清移液管将血浆（至少 2mL）移入标记好的圆锥底的离心管中。
- 制备好的血浆样本应立即放入  $-25\sim -15^\circ\text{C}$  冰箱中，保存不超过 2 周，反复冻融不超过 1 次。

## 【检验方法】

### 1. 血浆游离 DNA 的提取

- 使用博尔诚（北京）科技有限公司生产的核酸提取试剂。
- 方法参照说明书的要求进行，取 2mL 血浆进行处理，最终 BisDNA 洗脱体积为  $37\ \mu\text{L}$ 。
- 若 BisDNA 不立即使用，可在  $2\sim 8^\circ\text{C}$  存储 24 小时，或在  $-25\sim -15^\circ\text{C}$  存储 72 小时，反复冻融不超过 1 次。

### 2. PCR 检测

#### 2.1. PCR 预反应液的准备

- 根据反应样本量，融化相应管数的 PCR 反应液，一管 PCR 最多用于 30 个样本（包含阳性对照品和阴性对照品），涡旋混匀 PCR 反应液 10~15 秒，短暂离心。
- 每个 PCR 反应需要  $25.8\ \mu\text{L}$  PCR 反应液和  $1.3\ \mu\text{L}$  聚合酶。按比例将相应体积的 PCR 反应液和聚合酶加入到 2.0mL 的离心管中。涡旋混匀 PCR 预反应液，短暂离心离心管，将管壁液滴离下来。

注意：配制好的 PCR 预反应液应立即使用。PCR 反应液和聚合酶使用完毕立即复冻。

#### 2.2. PCR 反应板准备 (Applied Biosystems 7500/SLAN-96S)

- 将  $25\ \mu\text{L}$  PCR 预反应液加至选定好 96 孔板孔中。加入  $25\ \mu\text{L}$  的 BisDNA 至 PCR 板对应的孔中。
- 用 MicroAmp® Optical Adhesive Film 胶膜或与 PCR 反应板适配的条形管盖密封， $1000\pm 100\text{rcf}$  离心 1 分钟。密封后的 PCR 板可在  $2\sim 8^\circ\text{C}$  放置不超过 4 小时。

#### 2.3 PCR 扩增

##### ● 软件要求

PCR 过程可使用 Applied Biosystems 7500，该仪器适配软件为 V2.0.5 及以上版本。

PCR 过程可使用 SLAN-96S，该仪器适配软件为 V8.2.2 软件及以上版本。

##### ● PCR 反应板加载

Passive Reference 设置必须为“none”，Septin9 选取 FAM 通道，MT-1A 选取 JOE 通道，Epo 选取 CY5 通道，ACTB 选取 ROX 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	升/降温速率*	荧光信号收集
阶段 1	活化	94°C	20 分钟	40%	
		62°C	5 秒	80%	
阶段 2	45 个循环	55.5°C	35 秒	80%	√
		93°C	30 秒	40%	
阶段 3	降温	40°C	5 秒	80%	

注: √代表荧光收集阶段

\*: 升降温速率在 SLAN-96S PCR 仪可采用默认模式。

### 3. 分析条件设置

#### 3.1. Applied Biosystems 7500 设置

- 设置基线 10-22 个循环, 设置 ACTB 阈值 20000, MT-1A 阈值为 70000, Epo 阈值为 40000, Septin9 阈值 140000。[\*]
- 用对照品验证 PCR 反应的有效性: 阳性对照品和阴性对照品的 PCR 结果均满足表 2 的参数要求时, 则认为本次 PCR 反应有效。

#### 3.2. SLAN-96S 设置

- 设置基线 10-22 个循环, 设置 ACTB 阈值 40, MT-1A 阈值 60, Epo 阈值 27, Septin9 阈值 80。[\*]
- 用对照品验证 PCR 反应的有效性: 阳性对照品和阴性对照品的 PCR 结果均满足表 2 的参数要求时, 则认为本次 PCR 反应有效。

[\*]: 相同机型的不同机器, 由于机器运行时间不同, 分析时阈值可作适当调整。

表 2: PCR 反应有效性参数信息

对照品结果	MT-1A 结果	Epo 结果	Septin9 结果	ACTB 结果
阳性对照品有效	$Ct \leq 37.5$	$Ct \leq 37.5$	$Ct \leq 37.5$	$Ct \leq 29.5$
阴性对照品有效	undetermined	undetermined	undetermined	$Ct \leq 34.5$

### 4. 质量控制

#### 4.1. 外源对照

该试剂盒包含阳性对照品和阴性对照品。应在每次反应中添加这些对照品以检测反应是否成功, 同时确保反应的有效性。阳性对照品和阴性对照品的反应 Ct 值应该在有效范围内, 如表 2, 如果反应 Ct 值在其有效范围之外, 此次测试结果无效。

#### 4.2. 内源对照

内源对照能够检测亚硫酸盐转化的 ACTB ( $\beta$ -actin) DNA，同时能够检测样品是否满足实验要求（包括样本制备是否正确，样本 DNA 含量是否满足要求）。如表 3, MT-1A、Epo、Septin9 PCR 反应的结果与 ACTB PCR 结果的 Ct 值相关。如果 ACTB PCR 结果的 Ct 值超出有效范围，则反应无效。因为过高的 ACTB Ct 值表示 BisDNA 浓度过低或者 PCR 反应的抑制。

#### 【阳性判断值】

使用本产品对 798 例临床样本的 MT-1A、Epo、Septin9 基因进行检测，为了确定最佳 cutoff 值，对检测数据进行了 ROC 分析，结合约登指数等统计指标，确定了试剂盒的 cutoff 值。

单次 PCR 结果的判定见表 3：

表 3：单次 PCR 反应的结果解释

单次 PCR 结果	MT-1A 结果	ACTB 结果
MT-1A 阳性	$Ct \leq 37.5$	$Ct \leq 34.8$
MT-1A 阴性	$Ct > 37.5$ 或无 Ct 值	$Ct \leq 34.8$
MT-1A 无效	任意结果	$Ct > 34.8$

单次 PCR 结果	Epo 结果	ACTB 结果
Epo 阳性	$Ct \leq 37.5$	$Ct \leq 34.8$
Epo 阴性	$Ct > 37.5$ 或无 Ct 值	$Ct \leq 34.8$
Epo 无效	任意结果	$Ct > 34.8$

单次 PCR 结果	Septin9 结果	ACTB 结果
Septin9 阳性	$Ct \leq 43.0$	$Ct \leq 34.8$
Septin9 阴性	$Ct > 43.0$ 或无 Ct 值	$Ct \leq 34.8$
Septin9 无效	任意结果	$Ct > 34.8$

#### 【检测结果的解释】

- 如果样本中 MT-1A、Epo、Septin9 中有一个、两个或三个检测为阳性，则判定该样本测试结果为阳性。
- 如果样本中 MT-1A、Epo 和 Septin9 同时检测为阴性，则判定该样本测试结果为阴性。
- 如果结果为其它情况，视为检测结果无效。

#### 【检测方法的局限性】

- 只能用于体外诊断。
- 本试剂盒不包含血浆处理及亚硫酸盐转化试剂，使用博尔诚（北京）科技有限公司生产的核酸提取试剂。
- 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应训练的试验者。
- 由于食管癌检测依赖于样本中肿瘤 DNA 的量，所以可能受样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄，其它疾病）以及肿瘤级别影响。样本的收集请严格按照【样本要求】中的

要求进行。

5.该产品在临床试验中针对结直肠癌病例特异度为 56.9%，胃癌病例特异度为 70.0%，肝癌病例特异度为 78.9%，临床使用过程中应注意上述癌种的干扰，应结合临床症状、体征及其他诊断结果综合判断。

5.

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床确诊的依据，应结合其他临床诊断结果进行判定。判断为阳性的患者，建议根据医生建议进一步检查以便确诊，判断为阴性的患者不排除患病的可能。

### 【产品的性能指标】

#### 1. 产品的性能指标

##### 1.1 外观

外包装盒，组分齐全，包装外观清洁、无泄漏、无破损。标志、标签字迹清楚。

##### 1.2 阳性符合率

检测 6 份企业阳性参考品 P1-P6，P1-P3 结果应为 MT-1A、Epo 和 Septin9 阳性；P4 结果应为 MT-1A 阳性；P5 结果应为 Epo 阳性；P6 结果应为 Septin9 阳性；阳性符合率应为 100%。

检测 2 份企业阳性参考品（临床样本）P7-P8，P7 结果均应为 MT-1A、Epo 阳性，P8 结果均应为 Epo、Septin9 阳性，阳性符合率应为 100%。

##### 1.3 阴性符合率

检测 4 份企业阴性参考品 N1-N4，结果均应为 MT-1A 阴性、Epo 阴性、Septin9 阴性，阴性符合率应为 100%。

检测 4 份企业阴性参考品（临床样本）N5-N8，结果均应为 MT-1A 阴性、Epo 阴性、Septin9 阴性，阴性符合率应为 100%。

##### 1.4 最低检出限

检测 3 份企业最低检出限参考品 S1-S3，各重复 3 次，S1 结果均应为 MT-1A 阳性、Epo 阳性、Septin9 阳性，S2 结果均应为 MT-1A 阳性、Epo 阳性，S3 结果均应为 Epo 阳性。

在血浆中 DNA 浓度为 6 copies/ $\mu$ L 时，本试剂盒最低可检出 0.75% 的目标基因甲基化。

##### 1.5 精密度

检测 2 份企业精密度参考品 J1-J2，各 10 次重复，结果均应为 MT-1A、Epo 和 Septin9 阳性，J1 和 J2 计算所测得 MT-1A、Epo、Septin9 和 ACTB Ct 值的变异系数（CV），均应不高于 5%。

#### 2. 其他干扰

干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：未甲基化 DNA (100ng/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, 40mg/mL)、红细胞 (0.4% v/v)、K<sub>2</sub>EDTA (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。

#### 3. 交叉反应

在以下临床诊断的疾病：胃癌、肝癌、大肠癌等患者中，已观察到阳性检测结果。

#### 4. 临床性能：

通过在6家中心，临床试验共入组受试者954例。试验结果显示，本产品与临床参考标准相比，临床灵敏度为85.5%（95%CI：82.8%，88.2%），临床特异度为93.6%（95%CI：90.3%，96.1%）。

#### 【注意事项】

##### 1. 本品仅用于体外诊断。

##### 2. 实验室注意事项

- 应减少实验样本中的交叉污染，包括DNA提取，亚硫酸盐转化和DNA洗涤等过程。
- 为防止在DNA提取过程中核酸酶混入样本，我们建议使用一次性的移液管和移液器头，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real-time PCR分析的专业人员完成。
- 为防止PCR扩增产物的污染，我们建议严格区分PCR步骤，分为PCR扩增前（血浆DNA的提取，纯化和PCR设置）和PCR扩增（如real-time PCR）。使用过的PCR平板应该置于一个不利于PCR产物扩散的地方，例如使用过的PCR平板从PCR仪取出之后，应立即置于自封袋中，封紧，并丢弃在指定的容器中。绝不要把使用后的PCR平板放在PCR仪外面，也不要打开用过的PCR平板。

##### 3. 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。受检人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】

无

#### 【参考文献】

1. Sawami Suzuki, Hiroko Nakano, et al. Epigenetic regulation of the metallothionein-1A promoter by PU.1 during differentiation of THP-1 cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 433 (2013) 349–353.
2. Katrin Steinmann, et al, Epigenetic Silencing of Erythropoietin in Human Cancers. *Genes & Cancer* 2(1) 65-73
3. Hiroaki Nagata, et al, Genome-wide screening of DNA methylation associated with lymph node metastasis in esophageal squamous cell carcinoma, *Oncotarget*, 2017, Vol.8, (No.23), p: 37740-37750
4. 《食管癌 诊疗规范（2018年版）》

#### 【基本信息】

注册人/生产企业名称：博尔诚（北京）科技有限公司

住所：北京市北京经济技术开发区宏达南路 18 号院 3 号楼 10 层

邮政编码：100176 客服热线：400-650-3186

传真：010-67880132 网址：<http://www.biochainbj.com/>

生产地址：北京市北京经济技术开发区宏达南路 18 号院 4 号楼 3 层、2 号楼 501-504 室、1  
幢-1 层-101 A 区和 B 区

售后服务单位名称：博尔诚（北京）科技有限公司

医疗器械生产许可证编号：

**【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】**

**【说明书核准及修改日期】**