

受理号：CSZ1900136

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：RNF180/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 6840

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
产品审评摘要.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究摘要.....	5
三、 临床评价摘要.....	13
四、 风险分析及说明书提示.....	19
综合评价意见.....	23

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

产品审评摘要

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	体积/数量
PCR 反应液	dNTPs、PCR Buffer、引物和探针	0.96mL × 2
聚合酶	Taq DNA 聚合酶	85 μL × 1 管
阴性对照	WBC DNA、BSA 和 1×TE Buffer	3.6mL × 3 管
阳性对照	细胞株 DNA、WBC DNA、BSA 和 1×TE	3.6mL × 3 管

(二) 产品预期用途

该产品用于体外定性检测人血浆中甲基化的 RNF180 及 Septin9 基因。

该产品适用于经临床医师诊断建议胃镜检查同时由于患者个人原因拒绝进行胃镜检查的患者。检测结果阳性不作为胃癌早期诊断或确诊的证据，检测结果阴性也不能排除胃癌的可能，患者最终诊断应依据胃镜检查结果。该产品不用于普通人群的肿瘤筛查。基于现有研究，仅限于有胃癌家族史者或 40 岁以上胃癌高风险人群检测。

(三) 产品包装规格

30 人份/盒

(四) 产品检验原理

RNF180/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, 使用血浆游离 DNA 提取试剂盒提取血浆中的游离 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; 步骤 2, 甲基化的 DNA 做三重 PCR 扩增, PCR 反应中的阻断剂和探针能区分甲基化和非甲基化序列, 甲基化序列得到扩增, 与甲基化 RNF180 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、临床前研究摘要

(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、探针、阻断剂、DNA 聚合酶、dNTPs、细胞株 DNA 和 WBC DNA。这些原料均是通过外购的方式获得。

其中引物、探针及阻断剂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；DNA 聚合酶、dNTPs 由供应商化学合成获得；细胞株 DNA 和 WBC DNA 由生产商经过接种、传代、收集和细胞系 DNA 的提取纯化获得。

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料为 TE 稀释液与细胞系 DNA，包括 RNF180 基因相应位点甲基化的细胞系 DNA, Septin9 基因相应位点甲基化的细胞系 DNA，RNF180 基因和 Septin9 相应位点未甲基化的 WBC DNA。这些 DNA 均经过甲基化特异性 PCR 及测序方法验证。

阳性参考品包括 9 种，分别命名为阳性参考品 P1-P9，其中阳性参考品 P1-P3 为一定 DNA 浓度不同的 RNF180 和 Septin9 双阳参考品；P4-P6 为一定 DNA 浓度不同的 RNF180 单阳参考品；P7-P9 为一定 DNA 浓度不同的 Septin9 单阳参考品。

阴性参考品包括 3 种，分别命名为阴性参考品 N1-N3。阴性

参考品 N1-N3 为一定 DNA 浓度不同的 RNF180 和 Septin9 均为阴性的参考品。

精密度参考品包括 1 种，命名为精密度参考品 J，为一定 DNA 浓度不同的 RNF180 和 Septin9 均为阳性的参考品。

检测限参考品包括 3 种，分别命名为检测限参考品 S1-S3，其中检测限参考品 S1 为低 DNA 浓度的 RNF180 和 Septin9 双阳参考品；S2 为低 DNA 浓度的 RNF180 单阳参考品；S3 为低 DNA 浓度的 Septin9 单阳参考品。

(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、DNA 聚合酶用量的确定、单多重体系的验证、PCR 反应液、阴/阳性对照品配方的确定等；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；对该产品适配的两种仪器 ABI7500 以及 ABI7500 Fast Dx 的检测结果的阈值进行了研究。

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：试剂盒外观、准确度（阳

性符合率、阴性符合率)、精密度、最低检测限的评估;对该试剂盒所适用的 PCR 仪机型 ABI7500 和 ABI7500 Fast Dx 进行了仪器评估;以及特异性研究(交叉反应和干扰试验等)

在试剂盒外观的研究中,选择连续生产的三批次试剂盒,主要针对试剂盒组分是否齐全,包装外观清洁、无泄露、无破损,标志、标签字迹清楚等情况进行目视观察。结果显示试剂盒外观符合质量的要求。

阴阳性参考品符合率的方法是使用企业阴/阳性参考品分别对三个批次的试剂盒进行检测,记录每次实验 Septin9、RNF180 和 ACTB 的 Ct 值,检测结果显示阳性符合率 100%、阴性符合率 100%。同时使用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一代测序结果一致。

精密度的研究使用了三种不同的样本,第一种样本是精密度参考品 J,三批次试剂盒分别在两种适配的仪器上进行检测。检测结果显示试剂盒检测的 RNF180 基因、Septin9 基因和 ACTB 基因的变异系数均小于等于 5%。第二种样本是通过在临床正常人血浆样本中添加一定浓度的细胞系 DNA 模拟精密度企业参考品进行验证,检测结果显示 RNF180 基因、Septin9 基因和 ACTB 基因的变异系数均小于等于 5%。第三种样本是通过临床胃癌混合血浆样本和临床正常人阴性混合血浆使用本试剂盒进行验

证,结果显示 RNF180 基因、Septin9 基因和 ACTB 基因的变异系数均小于等于 5%。

最低检测限的研究中使用了三种不同的样本,第一种样本是通过配制不同浓度的阳性企业参考品,每种浓度下的参考品使用本试剂盒检测 20 次,检测结果显示,在细胞系 DNA 浓度为 35pg/mL 时,RNF180 基因的阳性检出率 100%,Septin9 基因的阳性检出率 100%,因此确定试剂盒最低检测限为 35pg/mL。第二种样本是通过在临床正常阴性血浆中添加含 35pg/mL 的细胞系 DNA,使用本试剂盒检测,结果显示 RNF180 基因和 Septin9 基因均为检测阳性。第三种样本是使用胃癌阳性血浆样本,进行稀释,通过相对定量方式确定,在 35pg/mL 浓度下,RNF180 基因和 Septin9 基因均可检测为阳性。

对本试剂盒联合使用并在说明书中推荐的血浆样本处理试剂(核酸提取试剂,京经械备 20140053 号,博尔诚(北京)科技有限公司)进行了游离 DNA 提取效率,亚硫酸盐转化效率的评估,与已上市产品对比,检测结果显示核酸提取效率与对比试剂一致,亚硫酸盐转化效率可达 99.58%。

对该产品适配的两种仪器 ABI7500 以及 ABI7500 Fast Dx 进行了性能评估,结果显示在两台机器上的阴/阳性符合率、最低检测限、精密度均符合质量要求,可以作为该产品的检测 PCR

仪。

对交叉反应的研究方法是使用 RNF180/Septin9 基因甲基化检测试剂盒 (PCR 荧光探针法) 检测其他易产生交叉反应的肿瘤患者样本, 确定甲基化肿瘤标志物 RNF180、Septin9 在其他恶性肿瘤中的表现。本研究选择肺癌、结直肠癌、肝癌、乳腺癌、食管癌、胰腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、宫颈癌, 共计 9 种癌症, 使用 RNF180/Septin9 基因甲基化检测试剂盒 (PCR 荧光探针法) 进行检测。根据实验结果, RNF180 和 Septin9 在各大癌症中均有一定的检出率, 除消化系统癌症较高外, 其他癌症均有一定比例的检出, 但远低于胃癌检出率。

在干扰试验的研究中, 选取日常服用的药物和临床血浆中可能存在的常规物质, 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, 临床血浆中可能存在的常规物质包括未甲基化 DNA、胆红素、血红蛋白、甘油三酯、血清白蛋白、红细胞、胆固醇、尿酸和葡萄糖, 以及临床采血管中存在的抗凝剂 K₂EDTA 等, 验证结果显示, 维生素 C (300mg/2000ml)、双氢氯噻嗪 (100mg/2000ml)、阿托伐他汀钙片 (80mg/2000ml)、阿司匹林 (8000mg/2000ml)、盐酸二甲双胍片 (2000mg/2000ml)、奥美拉唑 (120mg/2000ml)、头孢曲松钠 (4000mg/2000ml)、对乙酰

胺基酚 (2000mg/2000ml)、阿莫西林 (4000mg/2000ml)、甲硝唑 (3600mg/2000ml)、地西洋片 (40mg/2000ml)、胆红素 (20 mg/dl)、胆固醇 (500 mg/dl)、葡萄糖: (1000 mg/dl)、血红蛋白 (1000 mg/dl)、人血清白蛋白 (4000 mg/dl)、甘油三酯 (1200 mg/dl)、尿酸 (1.4mmol/l =23.5 mg/dl)、K₂EDTA (2000 mg/dl)、红血球 (0.4% v/v)、Septin9 和 RNF180 区域未甲基化的 WBC DNA (35ng/ml) 对本试剂盒的检测无影响。

(四) 阳性判断值或参考区间研究

申请人采用 ROC 曲线法确定阳性判断值。申请人采用本产品对 961 例临床样本进行检测, 其中包括其中胃癌样本 393 例 (I 期 66 例、II 期 68 例、III 期 173 例、IV 期 33 例、分期不明 53 例), 浅表性胃炎样本 184 例, 萎缩性胃炎样本 170 例, 其他胃部疾病样本 39 例, 其他癌症样本 175 例 (大肠癌、食管癌、胰腺癌等)。

试验结果显示 ACTB 基因的 Ct 值 ≤ 34.8 时, 样本检测结果有效。在确定样本检测结果有效的情况下, 确定了针对 RNF180 基因的 Cutoff 值为 $dCt \leq 9.0$ 、Septin9 基因的 Cutoff 值为 Ct 值 ≤ 45.0 , 同时由于本产品采用三平行重复的复孔检测, 单个基因的结果在 2/3 阳性或 3/3 阳性时, 判定为检测阳性。当 RNF180 基因、Septin9 基因分别有一个为检测阳性或两个均为

检测阳性时，可判定为检测阳性。

(五) 稳定性研究

申请人对该产品的稳定性的研究包括货架效期稳定性、反复冻融稳定性、运输稳定性、血液样本的稳定性、血浆样本的稳定性及 BisDNA 的稳定性。

货架效期稳定性：选择三批次试剂盒置于 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存，在储存后的第 0、3、6、9、12、13、14 个月后进行检测，对企业参考品及阴/阳性对照品检测的结果结果显示：产品在生产后 14 个月的产品性能满足质量的要求，试剂性能稳定。产品有效期可达 12 个月。

反复冻融稳定性：使用三批次试剂盒在规定的储存条件下，取出试剂盒反复冻融 3 次，检测每次冻融后的试剂盒的稳定性；对企业参考品及阴/阳性对照品检测的结果表明试剂盒在反复冻融 3 次的条件下的产品性能均能够满足质量的要求。因此声称本试剂盒在冻融两次条件下的稳定性良好。

运输稳定性：取三批次 RNF180/Septin9 基因甲基化检测试剂盒（PCR 荧光探针法）使用泡沫加干冰装填包装后，用快递寄至外地未开箱再寄回本公司共 7 天，运输完成后，放置于 $-25^{\circ}\text{C} \sim -15^{\circ}\text{C}$ 的冰箱中储存，在第 12 个月过后，进行检测。对企业参考品及阴/阳性对照品检测的结果表明该产品在干冰运输的条

件下运输 7 天以及在效期末的检测结果的各项性能指标均能够满足质量的要求。

申请人对血液样本、血浆样本及 BisDNA 的样本稳定性进行研究，研究表明全血采集后的血液样本，最好应立即放入到 2~8℃ 冰箱保存，血浆样本的储存条件为 -25~-15℃，且在 14 天内血浆样本稳定性良好，BisDNA 可在 2~8℃ 保存 24 小时，-25~-15℃ 保存 72 小时稳定性良好。

三、临床评价摘要

(一) 临床总研究结果分析

申请人在中国人民解放军空军军医大学第一附属医院、北京肿瘤医院、天津市肿瘤医院、西安交通大学第二附属医院、厦门大学附属中山医院、中国医学大学附属第一医院共六家临床试验机构完成了临床试验。采用胃镜和/或病理的等临床诊断结果为对照方法，对比验证考核试剂的有效性和安全性，从而评估考核产品的临床性能。

通过采用盲法、对照的试验设计共筛选有效病例 1382 例。其中胃癌病例 680 例，非胃癌病例 702 例。胃癌病例涵盖了胃癌不同分期的患者，占总入组病例数的 49.20% (680/1382)。非胃癌病例包括交叉反应人群样本共 702 例，其中含对照组共 536 例 (包括：浅表性胃炎、萎缩性胃炎、胃息肉、肠化生、低级

别内瘤变、其它胃良性疾疾病及其它疾病（胃溃疡、糜烂性胃炎等）和良性肿瘤），166例其它癌症样本（包括主要高发癌症：肺癌、肝癌、乳腺癌、食管癌和肠癌；还有发病率较低的癌症：胰腺癌和卵巢癌）。

以胃镜和/或病理结果检测结果为参照，计算考核试剂盒的符合率、灵敏性与特异性等指标。临床试验结果显示，考核试剂对胃癌的检测灵敏性为61.76%（420/680），特异性为85.07%（456/536）。对六家临床试验机构入组的680例不同分期胃癌患者结果分别进行统计。由结果可见，经胃镜和/或病理结果确定为病例组的样本共680例，试剂盒检出I期灵敏性为50.00%，II期的灵敏性为62.32%，III期的灵敏性为67.68%，IV期的灵敏性为82.00%，分期不明灵敏性为55.88%。

在临床试验中，对比分析同时有其他肿瘤标志物结果和考核试剂盒检测结果的样本（目前临床中常用的肿瘤标志物主要有AFP、CEA、CA199、CA125、CA724等）。

对各肿瘤标志物对样本各分期的阳性率进行统计，且与试剂盒的阳性率对比情况见图1：

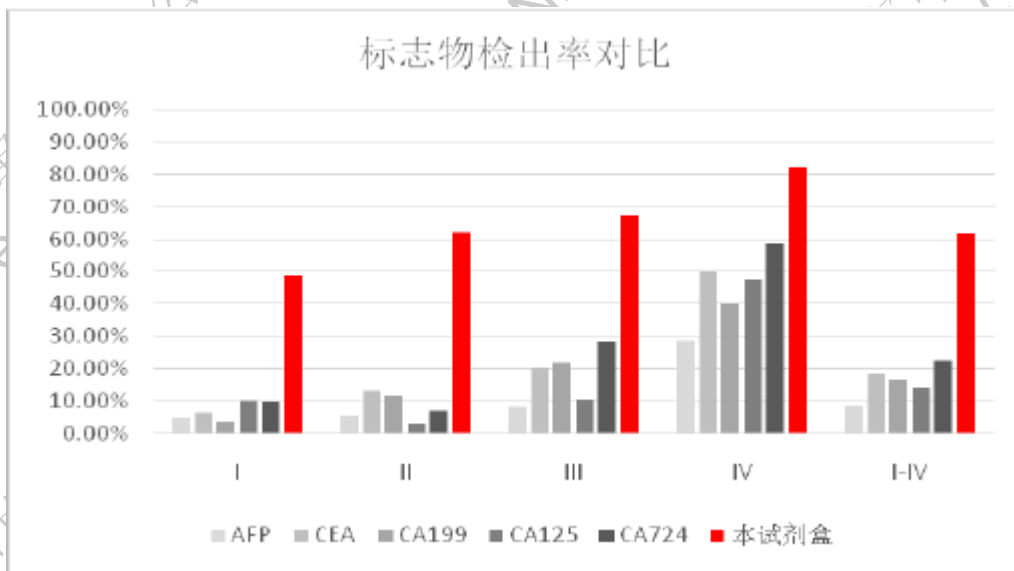


图1 标志物检出率对比

由结果可见，考核试剂盒对病例组的检测灵敏性比传统蛋白肿瘤标志物高。

(二) 临床前瞻性研究结果分析

对临床试验中易患胃癌需要胃镜检查的 433 例受试者进行了前瞻性的结果分析，这些受试者是需要进行胃镜检查的易患胃癌的受试者（易患胃癌），按照双盲法入组的，在接受本检测前入组工作人员和检测人员并不知道受试者是否患有胃癌，这些受试者是本产品预期用途中对应的需要胃镜检查的易患胃癌的人群。

前瞻性的结果分析是对临床试验中 433 例易患胃癌需要胃镜检查的受试者通过胃镜和/或病理诊断结果进行样本分组，胃癌病例组为 124 例，对照组为 309 例。其中对照组样本包括浅

表性胃炎、萎缩性胃炎、其它胃良性疾病及其它疾病、胃息肉、肠化生、良性肿瘤（胃部良性肿瘤及其它良性肿瘤）等。

以胃镜和/或病理结果检测结果为参照，计算考核试剂盒的符合率、灵敏性与特异性等指标。前瞻性的分析结果是：本试剂盒对易患胃癌需要胃镜检查受试者中胃癌患者检测的灵敏性及特异性分别为 62.10% 和 85.44%，这两个数据和含有确诊胃癌受试者的总体临床试验中对胃癌患者检测的灵敏性和特异性（61.76%和 85.07%）数据相近。

按照临床试验分组标准，易患胃癌需要胃镜检查的受试者共计 433 例入组，经分析后可见入组者均为胃部相关疾病，其中富集了胃癌的患者，有 124 例，基本排除了其他癌症样本入组的可能性，如肺癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌等。由于在易患胃癌需要胃镜检查的人群中富集了患有胃癌的人群，在 Septin9 检测阳性受试者中，未发现肠癌和其他癌症患者，在 RNF180 检测阳性受试者中，也未发现其他癌症患者，说明尽管 Septin9 和 RNF180 在其他癌症中有略升高或较高的检出率，但是在本产品预期用途的易患胃癌需要胃镜检查的人群中，由于其他癌症多不具备胃癌的症状而被排除在外。进一步提示在本产品预期用途的易患胃癌需要胃镜检查的人群中使用本产品，由于主要人群为患有胃癌的人群，对患有胃癌人群的检测机会

得到提高；同时，由于有效的排除了患有其他癌症的人群，对其他高发癌症如肺癌、肝癌、乳腺癌、结直肠癌等接受本产品检测的机会相对降低，从而减少了其他癌症对本产品检测胃癌这一预期用途的影响。

对易患胃癌并需要胃镜检查的受试者也进行了目前临床中常用的肿瘤标志物如 AFP、CEA、CA199、CA125、CA724 等的分析，因这几种肿瘤标志物并非每个入组的受试者都检测，我们选取有同时有其他肿瘤标志物结果和甲基化检测结果的样本，做对比分析。结果显示，本产品比传统肿瘤标志物的灵敏性高。这一结果也符合总体临床试验中的结果。

（三）临床回顾性研究结果分析

除去前瞻性样本 433 例，回顾性样本共计 783 例，这些回顾性样本是按照单盲法入组的已知胃镜结果的受试者，在接受本检测前入组工作人员已知受试者是否患有胃癌，而检测人员并不知道受试者是否患有胃癌。通过胃镜和/或病理诊断结果进行样本分组，病例组为 556 例，对照组为 227 例。其中对照组样本包括浅表性胃炎、萎缩性胃炎、其它胃良性疾病及其它疾病、胃息肉、肠化生、良性肿瘤（胃部良性肿瘤及其它良性肿瘤）等。

试剂盒检测结果为阳性的共 378 例：其中病例组有 343 例，

对照组有 35 例；试剂盒检测结果为阴性的共 405 例：其中病例组有 213 例，对照组有 192 例。以胃镜和/或病理结果检测结果为参照，计算考核试剂盒灵敏性与特异性等指标。回顾性样本的分析结果是：灵敏性为 61.69%，特异性为 84.58%。

这两个数据与上述前瞻性样本分析中易患胃癌需要胃镜检查的人群检测的灵敏性和特异性（62.10% 和 85.44%）以及总体临床试验中对胃癌患者检测的灵敏性和特异性（61.76%和 85.07%）数据接近。

对回顾性样本也进行了目前临床中常用的肿瘤标志物如 AFP、CEA、CA199、CA125、CA724 等进行分析，因这几种肿瘤标志物并非每个入组的受试者都检测，我们选取同时有其他肿瘤标志物结果和甲基化检测结果的样本，做对比分析。结果显示，本产品比传统肿瘤标志物的灵敏性高。这一结果与前瞻性样本分析结果一致，同时也符合总体临床试验中的结果。

（四）相关因素分析

申请人对临床试验中的受试者年龄分层进行了统计：其中 ≥ 40 岁的病例组 651 例，对照组 428 例，正常人 124 例； ≥ 50 岁的病例组 581 例，对照组 283 例，正常人 69 例；统计结果显示，以 40 岁和 50 岁为分界点， ≥ 40 岁人群和 ≥ 50 岁人群的阳性率，在病例组、对照组中均没有差异。

申请人对临床试验中的受试者性别进行了分层统计：病例组分别收集了 493 例男性、187 例女性，对照组 242 例男性、294 例女性，正常人群 66 例男性、120 例女性，符合胃癌的流行病学特征。统计结果显示，对照组中男性和女性的阳性率无明显差异；病例组中女性检测阳性率略高于男性。

四、风险分析及说明书提示

本产品根据“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 RNF180/Septin9 基因甲基化检测试剂盒（PCR 荧光探针法）进行风险分析。

（一）受益评估

世界卫生组织发布的《全球癌症报告 2014 显示》，胃癌新增和死亡人数占比已超过了 40%。东亚地区是胃癌高发区，中国、日本、韩国 3 个国家的胃癌总人数约占全球的 70%左右。目前胃癌检测的金标准为胃镜检查，常规肿瘤标志物对胃癌的平均检出率不到 20%。该试剂盒适用于经临床医师诊断建议胃镜检查同时由于患者个人原因拒绝进行胃镜检查的患者，患者最终诊断应依据胃镜检查结果。基于现有临床试验结果，对胃癌的临床灵敏度为 61.76%，特异性为 85.07%。

（二）风险评估

申报产品检测结果会受到样本类型、样本制备和保存、实

验操作、实验环境等限制，导致可能出现检测结果无效。使用者需了解检测过程中可能存在的潜在风险和检测方法的局限性。

申报产品不直接接触患者，但需医院专业人员采取患者血液样本，交由专业人员来实现预期用途。

申报产品对环境无影响，但是推荐使用的血浆处理试剂盒中含有 TRIS-盐酸、异硫氰酸胍、亚硫酸氢氨、四氢糠醇，推荐产品使用中及使用后废物的不适当处理有可能会造成环境的污染。

申报产品使用后无需特殊的退出模式。使用后产生的废物需按医疗垃圾做专业处理，以防止造成医源性污染。

申报产品的使用无需安装，但需对市用制进行专门的培训。产品的成功使用，取决于操作员的正确使用，因此再说明书中详细列出了正确操作的注意事项。

申报产品通过原材料、配制、检测、标志、包装、运输、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，从注册产品标准和使用说明书及企业规章制度对产品质量的全过程和风险防范措施，可以看出，申报产品的安全风险降到了可以接受的程度，能达到市用制可接受的水平，同时没有带来新的危害与安全风险。在目前认知水平

上，认为该产品上市带来的受益大于风险。

产品说明中对于安全风险的提示信息如下：

1. 采集后的血样应立即离心制备血浆，如不能及时处理，并于 30 分钟内放入 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. 禁止使用离心机刹车（急停）功能，以防止破坏血细胞层。

3. 制备好的血浆样本应立即放入 -25~-15℃ 冰箱中，保存不超过 2 周。

4. 若 BisDNA 不立即使用，可在 2~8℃ 存储 24 小时，或在 -25~-15℃ 存储 72 小时。

5. 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。

6. 每一管 PCR 反应液冻融次数不超过 2 次，使用两次后剩余的残液应丢弃。

7. 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。

8. 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。

9. 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。

10. 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。

11. 产品的说明书中同时描述了相关注意事项。

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，属于创新审批项目（编号：201700027）。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。

2020年04月24日

附件：产品说明书

RNF180/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：RNF180/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】

该产品用于体外定性检测人血浆中甲基化的 RNF180 及 Septin9 基因。

该产品适用于经临床医师诊断建议胃镜检查同时由于患者个人原因拒绝进行胃镜检查的患者。检测结果阳性不作为胃癌早期诊断或确诊的证据，检测结果阴性也不能排除胃癌的可能，患者最终诊断应依据胃镜检查结果。该产品不用于普通人群的肿瘤筛查。基于现有研究，仅限于有胃癌家族史者或 40 岁以上胃癌高风险人群检测。

胃癌按《恶性肿瘤 TNM 分类法》的分期，在癌症早期几乎不会有症状，以消瘦为最多，其次为胃区疼痛、食欲不振、呕吐等。早期胃癌的首发症状，可为上腹不适(包括上腹痛，多偶发)，或饱食后剑突下胀满、烧灼或轻度痉挛性痛，可自行缓解；或食欲减退，稍食即饱。少数患者因上腹部肿物或因消瘦，胃穿孔或转移灶而就诊。但常因症状轻微和不典型而被忽视。RNF180 (ring finger protein 180) 是肿瘤抑制因子，RNF180 启动子甲基化在胃癌组织中导致 RNF180 低表达或不表达，通过 HGF、CCR-7、MMP-2、VEGF 等多条信号通路促进胃癌细胞的发生及增殖。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，在胃癌患者血浆样本中甲基化的 RNF180 及 Septin9 基因含量特征性增高。

【检验原理】

RNF180/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，使用血浆游离 DNA 提取试剂盒提取血浆中的游离 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；步骤 2，甲基化的 DNA 做三重 PCR 扩增，PCR 反应中的阻断剂和探针能区分甲基化和非甲基化序列，甲基化序列得到扩增，与甲基化 RNF180 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	体积/数量
PCR 反应液	dNTPs、PCR Buffer、引物和探针	0.96mL×2 管
聚合酶	Taq DNA 聚合酶	85 μ L×1 管
阴性对照品	WBC DNA、BSA 和 1×TE Buffer	3.6mL×3 管
阳性对照品	细胞株 DNA、WBC DNA、BSA 和 1×TE Buffer	3.6mL×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：

- 血浆游离 DNA 提取和亚硫酸盐转化试剂盒（推荐使用试剂盒名称：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）
- 无水乙醇（分子生物级别，浓度高于 99.5%）；
- 15 mL 聚丙烯离心管带有圆锥型底，无菌；
- 2.0 mL 离心管，圆底带有联体螺旋型的密封盖；
- 带有过滤装置的吸头，包括 2-100 μ L、50-1000 μ L 规格；
- 连续分液器枪头，包括 0.5 mL、1 mL、10 mL、25 mL 规格；
- 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；
- 存储 DNA 的 96 孔板；包括 0.1mL、0.2mL 规格；
- 96 孔板密封膜；
- 96 孔板密封膜的手动压膜器；
- 可再封闭型塑料袋；10 \times 15 cm；
- 可竖立的 5 mL 密封冻存管；
- 采血管：如 BD 的 10 mL，K₂EDTA 负压抗凝管。

【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。

试剂盒于 -25~-15 $^{\circ}$ C 条件下存储。

每一管 PCR 反应液冻融次数不超过 2 次，使用两次后剩余的残液应丢弃。

生产日期及失效日期详见产品标签。

【适用仪器】

ABI 7500、ABI 7500 Fast Dx。

【样本要求】

血样的收集和存储按以下执行：

1、全血采集

- 采血量：10mL。
- 采血方法：使用 K₂EDTA 抗凝采血管(如 BD Vacutainer® K₂EDTA 10mL 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，并于 30 分钟内放入 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±150rcf。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 15 mL 离心管中。
- 离心血浆 12 分钟，离心力 1350±150rcf。用新的一次性移液管或者血清移液管将 3.5 mL 血浆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~-15℃ 冰箱中，保存不超过 2 周。

【检验方法】

1. 血浆游离 DNA 的提取

- 按说明书的要求进行游离 DNA 的提取和亚硫酸盐的转化。
- 若 BisDNA 不立即使用，可在 2~8℃ 存储 24 小时，或在 -25~-15℃ 存储 72 小时。

2. PCR 检测

2.1. PCR 预反应液的准备

- BisDNA 样本：病人样本、阳性对照品、阴性对照品实行三次 PCR 平行测试。
- 根据反应样本量，融化相应管数的 PCR 反应液，1 管 PCR 反应液最多用于 16 个样本（包括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 19.2 μL PCR 反应液和 0.8 μL 聚合酶按表 1 的比例将相应体积的 PCR 反应液和聚合酶加入到 2.0 mL 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。

表 1 PCR 预反应液的准备

	5 个样本量 (15 个 PCR 反应)	10 个样本量 (30 个 PCR 反应)	15 个样本量 (45 个 PCR 反应)	20 个样本量 (60 个 PCR 反应)
--	-------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

PCR 反应液	288.0 μL	576.0 μL	864.0 μL	1152.0 μL
聚合酶	12.0 μL	24.0 μL	36.0 μL	48.0 μL

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/Applied Biosystems 7500 Fast Dx)

- 每个样本需要 3 次 PCR 平行反应，在 96 孔板孔中，每个 PCR 反应孔中加入 18 μL PCR 预反应液和 12 μL 的 BisDNA。
- 用 MicroAmp® Optical Adhesive Film 胶膜密封，1000±100rcf 离心 1 分钟。密封后的 PCR 板可在 2~8℃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 SDS V2.0 及以上版本。

PCR 过程可使用 AppliedBiosystems 7500 Fast Dx，该仪器适配软件为 SDS V1.4 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，RNF180 选取 ROX 通道，ACTB 选取 JOE 通道，如表 2 所示设置反应程序：

表 2 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℃	20 分钟	40%	
阶段 2	45 个循环	62℃	5 秒	80%	
		55.5℃	35 秒	80%	X
		93℃	30 秒	40%	
阶段 3	降温	40℃	5 秒	80%	

注：X 代表荧光收集阶段

3.分析条件设置

3.1Applied Biosystems 7500 设置

- 设置基线 10-22 个循环，设置 ACTB 阈值 8000，RNF180 阈值为 8000，Septin9 阈值 16000。[*]
- 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三次 PCR 重复均满足表 2 的参数要求时，则认为本次 PCR 反应有效。

3.2Applied Biosystems 7500 Fast Dx 设置

- 设置基线 10-22 个循环，设置 ACTB 阈值 30000，RNF180 阈值 25000，Septin9 阈值 75000。[*]
- 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三次 PCR 重复均满足表 3 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 3 PCR 反应有效性参数信息

对照品结果	检测	RNF180 结果	Septin9 结果	ACTB 结果
阳性对照品有效	PCR1	Ct≤40.0	Ct≤40.0	Ct≤29.6
	PCR2	Ct≤40.0	Ct≤40.0	Ct≤29.6
	PCR3	Ct≤40.0	Ct≤40.0	Ct≤29.6
阴性对照品有效	PCR1	undetermined	undetermined	Ct≤35.1
	PCR2	undetermined	undetermined	Ct≤35.1
	PCR3	undetermined	undetermined	Ct≤35.1

【质量控制】

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 3，如果反应 Ct 值在其有效范围之外，此次测试结果无效。

2. 内源对照

内源对照能够检测亚硫酸盐转化的 ACTB (β -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，RNF180 和 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】

单次 PCR 结果的判定见表 4：

表 4 单次 PCR 反应的结果解释

单次 PCR 结果	RNF180 结果	ACTB 结果
RNF180 阳性	$\Delta Ct^* \leq 9.0$	Ct≤34.8
RNF180 阴性	$\Delta Ct^* > 9.0$ 或无 ΔCt^* 值	Ct≤34.8
无效	任意结果	Ct>34.8

单次 PCR 结果	Septin9 结果	ACTB 结果

Septin9 阳性	Ct<45.0	Ct≤34.8
Septin9 阴性	Ct≥45.0 或无 Ct 值	Ct≤34.8
无效	任意结果	Ct>34.8

*RNF180 的 Ct 值与 ACTB 的 Ct 值差值。

注意：单次 PCR 结果的阴阳性以 Ct 值为判定标准，而不以 S 型曲线判定。

【检测结果的解释】

1. 如果 RNF180 三次重复 PCR 反应中有两次或三次检测阳性，则样本的 RNF180 测试结果为“阳性”；如果 RNF180 三次结果有两次或三次为检测阴性，则样本的 RNF180 测试结果为“阴性”。见表 5：

表 5 样本中 RNF180 结果判读

PCR 阳性结果次数	0/3	1/3	2/3	3/3
RNF180 样品结果	阴性	阴性	阳性	阳性

2. 如果 Septin9 三次重复 PCR 反应中有两次或三次检测阳性，则样本的 Septin9 测试结果为“阳性”；如果 Septin9 三次结果有两次或三次为检测阴性，则样本的 Septin9 测试结果为“阴性”。见表 6：

表 6 样本中 Septin9 结果判读

PCR 阳性结果次数	0/3	1/3	2/3	3/3
Septin9 样品结果	阴性	阴性	阳性	阳性

建议一次阳性，列为疑似，建议结合其他临床指标，择期复测。

3. 如果结果为其它情况，视为无效。

4. 如果样本中按表 5 和表 6 判断 RNF180 和 Septin9 中任意一个为检测阳性，则判定该样本为检测阳性。

5. 如果样本中 RNF180 和 Septin9 同时为检测阴性，则判定该样本为检测阴性。见表 7：

表 7 样本 RNF180 和 Septin9 检测结果联合判读

阳性率		Septin9			
		0/3	1/3	2/3	3/3
RNF180	0/3	阴性	阴性	阳性	阳性
	1/3	阴性	阴性	阳性	阳性
	2/3	阳性	阳性	阳性	阳性
	3/3	阳性	阳性	阳性	阳性

【检测方法的局限性】

1. 本试剂盒不包含血浆游离 DNA 提取和亚硫酸盐转化试剂盒，推荐使用本公司生

产的“核酸提取试剂”。

2. 该产品的使用者应该是接受过 PCR 反应训练的试验者。

3. 由于胃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。

4. 此结果不能作为确诊胃癌的证据。任何甲基化 RNF180 和 Septin9 基因检测呈阳性的患者还需接受胃镜的进一步检查以便确诊。

5. 其他消化道肿瘤如大肠癌、肝癌和食道癌会有一定检出。

6. 因为胃癌的发病率会随着年龄的增长而发病人群会显示增加，低年龄段相关人群胃癌发病率低于高年龄段人群，低年龄段相关人群胃癌发病率低而导致的阳性预测值偏低，普通人浅表性胃炎也有百分之十几的该指标阳性检测率。为避免因可能导致过高的假阳性风险，故不建议在低年龄段相关人群中进行该检测。

7. 该甲基化基因 RNF180 和 Septin9 基因检测试剂盒的检测结果应结合其它临床指标进行评估。

8. 通过上千例临床试验证实，试剂盒测试胃癌的灵敏度为 61.76%，特异性为 85.07%。

9. 胃部不适症状可能由多种原因引发，如胰腺癌、结肠癌等。本试剂盒为胃镜检查的补充手段，临床医师应结合做胃镜的临床指征，选择是否采用本试剂盒检测。

10. 胃低级别内瘤变会有一定例数检出，胃高级别内瘤变会有较高漏检。

【产品性能指标】

1. 产品的性能指标

1.1 最低检出限

测定检测限企业参考品(S1-S3)，结果为 S1:RNF180 阳性、Septin9 阳性，S2: RNF180 阳性、Septin9 阴性，S3: RNF180 阴性、Septin9 阳性。

1.2 精密性

对精密度企业参考品(J)进行重复 10 次测试，全部为 RNF180 阳性、Septin9 阳性，计算所测得 RNF180、Septin9 及 ACTB Ct 值的变异系数 (CV)，均应不高于 5%。

1.3 阳性符合率

检测 9 份阳性企业参考品(P1-P9)，阳性符合率为 100%。

1.4 阴性符合率

检测 3 份阴性企业参考品(N1-N3)，阴性符合率为 100%。

2. 其它干扰

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)、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。

3. 交叉反应情况

3.1 在以下临床诊断的疾病：慢性胃炎、肝癌、食管癌、肺癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌和宫颈癌等患者中，已观察到阳性检测结果。

3.2 胃部不适症状可能由多种原因引发，如胰腺癌、结肠癌等。

4. 临床情况

4.1 通过 1382 例临床试验证实，试剂盒测试胃癌的灵敏度为 61.76%，特异性为 85.07%。

4.2 本试剂盒对病例组的检测灵敏度比传统蛋白肿瘤标志物高 40%左右，其中在 I 期灵敏度比传统蛋白肿瘤标志物高 40%左右，II 期灵敏度比传统蛋白肿瘤标志物高 50%左右。

4.3 本试剂盒检测年龄 40 岁以上和 50 岁以上组无明显差异，建议检测年龄为 40 岁以上人群；对照组中男性和女性的阳性率无差异；病例组中女性检测阳性率略高于男性。

4.4 本试剂盒对临床试验中前瞻性样本检测胃癌的灵敏性为 62.10%，特异性为 85.44%。

4.5 本试剂盒对临床试验中回顾性样本检测胃癌的灵敏性为 61.69%，特异性为 84.58%。

【注意事项】

1. 只能用于体外诊断。
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. Kin-Fai Cheung, Cleo N. Y. Lam, et al. Characterization of the Gene Structure, Functional Significance, and Clinical Application of RNF180, a Novel Gene in Gastric Cancer. *Cancer*, February 15, 2012; p. 947-959.
2. Jingyu Deng, Han Liang, et al. Methylation of CpG sites in RNF180 DNA promoter prediction poor survival of gastric cancer. *Oncotarget*, Vol. 5, No. 10: p. 3173-3183.

【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

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

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

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】



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED

hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES

医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER

医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE

MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE