受理号：CSZ2000050

# 体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测试剂盒（PCR 荧光探针法-胶体金法）

产品管理类别：第三类 6840

申请人名称：杭州诺辉健康科技有限公司

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 .....6
三、临床评价摘要.....16
四、风险受益综合评价.....19
综合评价意见.....21

# 基本信息

**一、申请人名称**

杭州诺辉健康科技有限公司

**二、申请人住所**

浙江省杭州市滨江区长河街道江二路400号2幢13层1313室

**三、生产地址**

杭州市滨江区长河街道长河路475号2幢2层201室

杭州市滨江区长河街道江二路400号2幢1层101、102、103、104、105、107、108室

杭州市滨江区长河街道江二路400号1幢1层102室（仓库地址）

# 产品审评摘要

## 一、产品概述

### （一）产品主要组成成分

表 1 试剂盒组成、规格

| 试剂盒组成 | 试剂组成 | 规格 | 数量 |
| --- | --- | --- | --- |
| 试剂 I | KRAS 反应液 A | 0.7mL/管 | 1 |
| | KRAS 反应液 B | 0.7mL/管 | 1 |
| | KRAS 反应液 C | 1.5mL/管 | 1 |
| | KRAS 阳性质控品 | 0.05mL/管 | 1 |
| | KRAS 阴性质控品 | 0.05mL/管 | 1 |
| 试剂 II | 甲基化反应液 A | 0.3mL/管 | 1 |
| | 甲基化反应液 B | 0.9mL/管 | 1 |
| | 甲基化阳性质控品 | 0.6mL/管 | 1 |
| | 甲基化阴性质控品 | 0.6mL/管 | 1 |
| 试剂 III | 变性液 | 0.6mL/瓶 | 1 |
| | 转化液 | 25mL/瓶 | 1 |
| | 柱结合液 | 35mL/瓶 | 1 |
| | DNA 纯化柱（含收集管） | 1 测试/管 | 48（2×48） |
| | 洗脱液 | 3mL/瓶 | 1 |
| 试剂 IV | 便隐血检测试剂条 | 1 测试/条 | 48 |

各组分的主要成分详见说明书。

该产品配套使用的样本采集装置和核酸提取试剂为杭州诺辉健康科技有限公司生产的粪便检验预处理装置（浙杭械备20160367号）和核酸提取或纯化试剂（浙杭械备20180059号）。

**（二）产品预期用途**

本试剂盒用于体外定性检测人粪便样本中的KRAS基因突变（包括但不区分G12D、G12A、G12V、G12S、G12R、 G12C、G13D）、BMP3和NDRG4基因甲基化及血红蛋白，各个指标的检测值通过“KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测分析软件”计算综合评分，用于对肠镜依从性差的结直肠癌高风险人群的筛查。综合评分大于或等于阳性判断值的样本为阳性，表示受检者体内可能有结直肠癌和/或进展期腺瘤，需要进一步接受肠镜检查；反之，如果综合评分低于阳性判断值，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。鉴于受试者为高风险人群，因此在必要时仍应建议进行肠镜检查。

该产品适用人群为年龄40-74岁的结直肠癌高风险人群(高风险人群判定参照中国结直肠肿瘤早诊筛查相关专家共识)。本产品不能替代肠镜，不能用于普通人群的肿瘤筛查，临床诊断过程中不应以本产品检测结果作为临床诊断的唯一依据。

**（三）产品包装规格**

48 测试/盒

**（四）产品检验原理**

本试剂盒基于荧光 PCR 技术和胶体金技术，对粪便样本中可能含有的脱落肠道癌变细胞中的变异核酸物质及粪便中可能潜隐的血红蛋白进行检测。

本试剂盒基因检测部分针对粪便DNA中的KRAS基因点突变及 BMP3 和 NDRG4 基因中 CpG 岛胞嘧啶甲基化。其中 KRAS 检测采用 TaqMan 探针及 ARMS PCR 达到对 KRAS 基因第二外显子 12 和 13 编码子上 7 种点突变的特异性检测。而甲基化检测首先将提纯的核酸经过亚硫酸盐处理，使没有甲基化的胞嘧啶（C）转化为尿嘧啶（U），而已甲基化的胞嘧啶则不会发生转化，然后使用特异性识别甲基化序列的引物和探针进行荧光PCR检测。

试剂盒的血红蛋白检测部分采用双抗体夹心胶体金法，由胶体金标记抗人血红蛋白抗体和检测试纸条检测线上（T）的抗人血红蛋白抗体对粪便样本中可能含有的人血红蛋白进行检测。

以上各项检测结果通过软件分析计算综合评分，对样本是否呈现指示肠癌及进展期腺瘤阳性的变化进行定性判断。

## 二、临床前研究摘要

**（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 DNA聚合酶、dNTP Mix，细胞DNA、DNA纯化柱、鼠抗人血红蛋白单克隆抗体、羊抗鼠IgG多克隆抗体和硝酸纤维素膜，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 DNA聚合酶由原材料供应商克隆表达后获得；dNTP Mix 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

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、检测限参考品及特异性参考品。质控品分为阳性质控品和阴性质控品。

企业参考品的主要原料有细胞DNA、粪便样本DNA、质粒、血红蛋白等组成。KRAS阳性参考品包括KRAS基因突变弱阳性参考品、KRAS基因突变中阳性参考品和KRAS基因突变强阳性参考品，以上参考品为一定DNA浓度下含不同比例的各KRAS基因突变

样本。BMP3/NDRG4基因阳性参考品包括甲基化弱阳性参考品、基因甲基化中阳性参考品和基因甲基化强阳性参考品，以上参考品为一定DNA浓度下含不同比例甲基化BMP3/NDRG4基因的样本。便隐血检测阳性参考品包括便隐血弱阳性参考品。

阴性参考品包括KRAS基因突变阴性参考品、BMP3/NDRG4基因甲基化阴性参考品及便隐血阴性参考品。

精密度参考品包括KRAS基因突变精密度参考品、BMP3/NDRG4 基因甲基化精密度参考品和便隐血精密度参考品。

检测限参考品包括9种， 分别为7种KRAS基因突变的检测限参考品、BMP3/NDRG4基因甲基化检测限参考品和便隐血检测限参考品。

特异性参考品有18种，包括7种KRAS基因突变特异性参考品，5种BMP3/NDRG4基因甲基化特异性参考品和6种便隐血特异性参考品。

阴性质控品和阳性质控品分别为一定浓度的阴性DNA样本和阳性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或B2M，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中包含了试剂Ⅰ、试剂Ⅱ、

试剂III和试剂IV。

其中试剂 I 和试剂 II 的反应体系研究包括TM Buffer, -Mg2+ 浓度的确定、MgCl2浓度的确定、dNTP Mix浓度的确定、Taq DNA聚合酶浓度的确定、引物探针浓度的确定、ROX浓度的确定、反应液体积以及阴/阳性质控品浓度等；对PCR过程中的退火温度进行研究。

试剂III的反应体系研究包括了变性液浓度的确定、转化液浓度的确定、柱结合液浓度的确定、脱硫液组分和浓度的确定，同时对转化温度、脱硫时间和洗脱条件进行了充分的研究。

试剂IV的反应体系研究包括了胶体金粒径的确定、鼠抗人血红蛋白单克隆抗体-胶体金的制备条件的确定、鼠IgG -胶体金的制备条件的确定、羊抗鼠多克隆抗体包被浓度及干燥参数的确定、羊抗鼠多克隆抗体包被量的确定、鼠抗人血红蛋白单克隆抗体浓度及干燥参数的确定、鼠抗人血红蛋白单克隆抗体包被量的确定、点金标结合物包被参数的确定、点金标结合物包被量的确定。并且对试剂用量、反应时间、结果保存时间及反应环境温度进行了充分的研究。完成样本的用量及样本保存时间的研究。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、精密度、分析灵敏度、分析特异性和钩状效应的研究，同时对粪便样本稳定性、粪便 DNA 样本稳定性、粪便 DNA 转化后样本稳定性以及不同粪便类型稳定性也进行了研究。

在试剂盒外观的研究中，选择连续生产的三批次试剂盒，针对试剂盒外观整齐、组分齐全、液体组分无渗漏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。

准确度研究使用模拟的检测限附近的弱阳性样本和阴性样本，以及真实阳性临床样本进行检测，结果显示模拟样本检测结果与预期结果阳性符合率为 100%、阴性符合率为 100%；临床样本检测结果与一代测序结果/已上市的便隐血(FOB)检测试剂结果一致。

精密度研究使用模拟的检测限附近的弱阳性样本和真实临床阴性样本，分别对三批次试剂盒在适配的仪器上由两位实验人员在 12 天进行连续的检测。结果显示试剂盒基因检测部分对模拟弱阳性样本的日内、日间、人员间、批间的 CV 值≤5%；对临床样本的日内、日间、人员间的 CV 值≤10%；试剂盒便隐血检测结果在以上因素变化的上下限之差不超出比色卡一个档次。

分析灵敏度研究通过配制不同浓度的模拟弱阳性样本，每浓度档次使用三批试剂盒检测 20 次，检测结果显示，10ng 人基因组 DNA 的背景下 1%突变时 7 种 KRAS 基因突变检测试剂阳性检出率≥95%，10ng 人基因组 DNA 的背景下 1%BMP3/NDRG4 基因甲基化时阳性检出率≥95%，血红蛋白浓度为 100ng/mL 时便隐血检测试剂阳性检出率 100%。随后另采用三批试剂盒对以上的分析检测限进行验证，结果表明试剂盒最低可在 10ng 人基因组 DNA 的背景下检测出不低于 1% 的 KRAS 基因突变，和不低于 1% 的 BMP3/NDRG4 基因甲基化；而试剂盒可检测到样本中不低于 100ng/mL 的人血红蛋白。

分析特异性研究包含特异性研究和干扰物研究:

特异性研究采用含非目标的其他 KRAS 突变的模拟样本，含非目标的其他甲基化基因的模拟样本以及细菌 DNA,动物血红蛋白使用三批次试剂盒在适配的仪器上对基因和血红蛋白分别进行检测。检测结果为 KRAS 基因扩增阴性、BMP3 和 NDRG4 基因扩增阴性、便隐血检测结果为阴性，说明该产品能够实现对 KRAS 基因突变、BMP3/NDRG4 基因甲基化、便隐血的特异性检测。

同时本研究收集肺癌、膀胱癌和类风湿性关节炎患者的粪便样本，使用本试剂盒进行检测，结果显示肺癌、膀胱癌、类风湿性关节炎患者的粪便样本不会影响本试剂盒的检测结果。

在干扰试验中，针对试剂Ⅰ/试剂Ⅱ/试剂Ⅲ选择以下潜在干扰药物进行研究：胃药斯达舒、甘露醇、布洛芬胶囊、黄连素、痔疮膏、奥美拉唑、盐酸左氧氟沙星、青霉素、四环素、头孢克肟、动物DNA、通便灵胶囊、盐酸雷尼替丁、感冒灵胶囊、植物油、西咪替丁、白蛋白、甘油三酯、铁蛋白、胆红素和植物组织DNA。针对试剂Ⅳ选择猪血红蛋白、牛血红蛋白、鸡血红蛋白、羊血红蛋白、兔血红蛋白、辣根过氧化物酶、肌红蛋白、维生素、小柴胡、叶酸、白蛋白、甘油三酯、铁蛋白、胆红素进行研究。

实验结果显示动物：胃药斯达舒（4.2 mg/g）、甘露醇（10 mg/g）、布洛芬胶囊（6 mg/g）、黄连素（6 mg/g）、痔疮膏（30 mg/g）、奥美拉唑（0.1 mg/g）、盐酸左氧氟沙星（3 mg/g）、青霉素（4.72 mg/g）、四环素（10 mg/g）、头孢克肟（2 mg/g）、动物DNA（100ng/g）、通便灵胶囊（12.5 mg/g）、盐酸雷尼替丁（3 mg/g）、感冒灵胶囊（30 mg/g）、植物油（300mg/g）、西咪替丁（4 mg/g）、白蛋白（15 mg/g）、胆红素（0.3 mg/g）、甘油三酯(12 mg/g)、铁蛋白(50 μg/g)和植物组织DNA(100ng/g)对试剂Ⅰ/试剂Ⅱ检测结果无影响。猪血红蛋白（0.5mg/mL）、牛血红蛋白（0.5mg/mL）、鸡血红蛋白（0.5mg/mL）、羊血红蛋白（0.5mg/mL）、兔血红蛋白（0.5mg/mL）、辣根过氧化物酶

（2mg/mL）、肌红蛋白（1μg/mL）、维生素 C（20mg/dL）、维生素 B1（20mg/dL）、小柴胡（500mg/mL）、叶酸亚铁片（500mg/mL）、中白蛋白（15 mg/g）、胆红素（0.3 mg/g）、甘油三酯（12 mg/g）、铁蛋白（50 μg/g）对试剂Ⅳ的检测结果无影响。且与最低检测限水平人血红蛋白同时存在时，不会导致假阴性检测结果的发生。

便隐血检测试剂钩状效应研究采用不同浓度梯度的人血红蛋白进行检测，结果显示：当人血红蛋白浓度大于 2mg/mL 时，试剂检测结果出现显色深度随浓度升高反而变浅的情况，即 2mg/mL 是出现钩状效应的最低浓度；在血红蛋白浓度大于 25mg/mL 时出现假阴性结果，因此本试剂出现钩状效应的浓度范围为 2mg/mL—25mg/mL。因本试剂为定性检测试剂，在此范围之内虽存在钩状效应，但检测结果仍为阳性，对正确判断不产生影响。

申请人对粪便样本、粪便 DNA 样本及粪便 DNA 转化后样本的稳定性进行研究，研究结果表明粪便样本常温可保存 7 天、<-60℃可保存 1 个月（仅针对试剂Ⅰ&Ⅱ&Ⅲ）；粪便 DNA 样本-25～-15℃可保存 6 个月；粪便 DNA 转化后样本-25～-15℃可保存 2.5 个月且反复冻融不超过 3 次。

不同粪便类型稳定性：根据布里斯托大便分型规则，使用

一批次试剂对不同粪便类型的适用性进行验证。实验结果表明，不同形状的粪便样本对本产品的检测性能无影响；但未成形的样本例如水样便由于无法正常取样影响试剂的性能。

**（四）阳性判断值**

该产品阳性判断值的研究采用临床来源粪便样本。628 例样本中结直肠癌 269 例、进展期腺瘤 64 例、非进展期腺瘤 24 例、肠息肉样本 20 例、正常人 251 例。

对这些样本的检测结果显示 ACTB 基因的 Ct 值<25 且 B2M 基因的 Ct 值<42 时，样本检测结果有效。在确定样本质量合格的情况下，根据临床对于检测灵敏度和特异性的需求分析，判定检测综合评分≥165 时判断为阳性；综合评分＜165 时判断为阴性。

因此，该产品的阳性判断值为：

当综合评分＜165 时，该样本的检测结果为阴性，

当综合评分≥165 时，该样本的检测结果为阳性，

当单项检测内参不符要求，造成综合评分 Invalid 时，该样本检测结果不合格。

**（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、反复冻融稳定性、运输稳定性。

货架效期稳定性：选择三批次试剂盒，定期对规定储存条件下保存的试剂盒进行检测，验证其货架效期稳定性；并记录实验结果和日期，形成报告。其三批次的货架效期稳定性项目的检测频次分别为如下所述：

201607001：自生产之日起每三个月检测一次直至第 15 个月，研究试剂盒的货架效期稳定性。

201607002：自生产之日起每三个月检测一次直至第 15 个月，研究试剂盒的货架效期稳定性。

201607003：自生产之日起每三个月检测一次直至第 15 个月，研究试剂盒的货架效期稳定性。

对各项参考品检测的实验结果表明：该产品在生产后 15 个月的产品性能满足质量要求，试剂性能稳定。产品有效期可达 12 个月。

开封稳定性：取一定量的效期内一批次试剂盒，开封使用状态下放置 0、2、4、6、8 周后检测试剂盒的稳定性。对各项参考品检测的实验结果表明：试剂 I 和试剂 II 开封 8 周后性能仍符合要求，因此建议试剂 I 和试剂 II 开封使用条件下存放时间可以达到 6 周；试剂 III 开封 2 周后性能符合要求，但开封 4 周后最低检测限参和阳性符合率考品性能不符合要求，因此建议试剂 III 开封使用条件下存放时间可以达到 2 周；试剂 IV 开封 4

周后性能符合要求，但开封 6 周后便隐血检测限参考品性能不符合要求，因此建议试剂Ⅳ开封使用条件下存放时间可以达到 4 周。

反复冻融稳定性：使用一批次试剂盒在规定的储存条件下，取出试剂 I 和试剂 II 反复冻融 6 次，检测每次冻融后的试剂盒的稳定性；将试剂 I 和试剂 II 放置在冰箱 4℃解冻后放回−25～−15℃保存，反复冻融 6 次，每次冻融检测 1 次。对各项参考品检测的实验结果表明，试剂 I 和试剂 II 在反复冻融 6 次条件下的产品性能均能够满足质量的要求。因此建议试剂 I 和试剂 II 反复冻融不超过 5 次。

运输稳定性：使用一批次试剂盒进行冷链运输；对运输后及运输后放置到有效期末的试剂盒进行检测。对各项参考品检测的实验结果表明，该产品在冷链运输条件下运输后以及运输后放置到效期末检测结果的各项性能指标均能够满足质量的要求。由此证明试剂 I 和试剂 II 在−25～−15℃条件下、试剂Ⅲ和试剂Ⅳ在 2～8℃条件下完成运输仍可保证产品 12 个月的效期，产品质量保持稳定。

## 三、临床评价摘要

申请人在浙江大学医学院附属第二医院、复旦大学附属肿瘤医院、南京医科大学第一附属医院（江苏省人民医院）、湖北

省肿瘤医院、四川大学华西医院、山西省人民医院、郑州大学第一附属医院、天津医科大学总医院共 8 家临床试验机构完成了临床试验。

临床试验主要包括三部分内容:

第一部分，采用试验用体外诊断试剂对结直肠癌高风险人群进行筛查，以结肠镜和/或病理检查结果为金标准，评价本产品筛查的灵敏度、特异度和阴性预测值等指标。

临床试验前瞻性入组 4245 例受试者，均为结直肠癌高风险人群（高风险人群判定参照中国结直肠肿瘤早诊筛查相关专家共识），其中经结肠镜和/或病理检查确诊结直肠癌 186 例，进展期腺瘤 375 例。临床试验结果显示，试验用体外诊断试剂针对结直肠癌患者筛查的灵敏度为 91.94%（95%CI：88.02%，95.85%），对进展期腺瘤患者筛查灵敏度 63.47%（95%CI：58.59%，68.34%），针对结直肠癌和进展期腺瘤筛查特异度为 87.08%（95%CI：86.00%，88.16%）；结直肠癌筛查阴性预测值 99.6%（95%CI：99.2%，99.7%）。

第二部分，为进一步验证试验用体外诊断试剂针对结直肠癌的临床灵敏度和特异度，临床试验中回顾性纳入不同分期结直肠癌确诊患者 419 例、其他消化道疾病患者和其他癌症患者 94 例，采用试验用体外诊断试剂进行检测，综合前瞻性和回顾

性入组的所有样本，评价本产品检测灵敏度和特异度。结果显示试验用体外诊断试剂针对结直肠癌患者检测灵敏度 95.54%（95%CI: 93.89%, 97.18%），检测特异度 87.11%（95%CI: 86.04%, 88.18%）。

第三，针对试验用体外诊断试剂检测 KRAS、BMP3/NDRG4 甲基化和便隐血的准确性进行验证。

KRAS 检测准确性验证，试验人群为本次临床试验中四家临床机构入组的结直肠癌患者（所有能够获得合格组织样本的病例），共计 341 例，采用试验用体外诊断试剂与已批准上市的结直肠癌组织样本KRAS基因突变检测试剂盒进行同源样本对比试验，入组样本覆盖试验用体外诊断试剂涉及的全部七种 KRAS 突变位点。结果显示两种检测方法的阳性符合率为 89.54%（95%CI: 83.69%，93.46%），阴性符合率为 94.68%（95%CI: 90.49%，97.09%）。

BMP3/NDRG4 甲基化检测准确性验证，试验人群为本次临床试验中三家临床机构入组的结直肠癌患者（所有能够获得合格组织样本的病例），共计 163 例，采用试验用体外诊断试剂与结直肠癌组织样本 Sanger 测序法进行同源样本对比试验，结果显示 BMP3/NDRG4 甲基化检测的阳性符合率分别为 92.06%（95%CI: 84.60%，99.53%）和 95.88%（95%CI: 89.78%，98.87%），阴性

符合率分别为98.00%(95%CI:92.96%,99.76%)和96.97%(95%CI:89.48%，99.63%)。

便隐血检测准确性验证，试验人群为本次临床试验所有入组人群，共计4758例，对比方法为已上市便隐血检测试剂。采用试验用体外诊断试剂与对比试剂进行比较研究，结果显示两种检测方法阳性符合率96.04%（95%CI：94.56%，97.52%），阴性符合率99.30%（95%CI：99.04%，99.57%）。

综上，临床试验结果显示，本产品用于结直肠癌高风险人群筛查具有良好的灵敏度和特异度。

## 四、风险受益综合评价

### （一）受益评估

随着人们生活水平不断提高和饮食习惯的改变，我国结直肠癌的发病率逐年升高，大多数患者发现时已属于中晚期。早期结直肠癌可无明显症状。目前按照结直肠癌早诊筛查专家共识，结直肠癌高风险人群均建议进行结肠镜检查，结肠镜下活检病理检查是目前诊断结直肠癌的金标准，但该检查为侵入性检查，患者依从性较差。

本产品同时检测便隐血和粪便中结直肠肿瘤细胞异常DNA片段，用于对肠镜依从性差的结直肠癌高风险人群的筛查。其临床应用的主要受益在于：针对肠镜依从性差的结直肠癌高风

险人群进行筛查，进一步评估患病风险，检测结果为阳性的患者，罹患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，避免因肠镜依从性差而导致疾病进展。

**（二）风险评估**

按照现行的结直肠肿瘤筛查策略和诊疗规范，对于结直肠肿瘤高风险人群，均建议进行结直肠镜检查。根据本产品临床试验结果，本产品主要风险在于高风险人群中 3.5‰的受试者可能因为本产品检测假阴性而贻误结直肠癌治疗，严重情况下可危及生命；这一风险在检测为阴性的受试者中发生的概率是 4.4‰。为避免该风险，产品说明书中明确标注：本产品检测结果综合评分低于阳性判断值时并不能完全排除疾病风险，鉴于受试者为高风险人群，因此在必要时仍应建议进行肠镜检查。同时基于该产品临床试验结论，明确该产品不能取代肠镜，不能用于普通人群的肿瘤筛查。

**（三）风险收益评价结论**

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，认为该产品能够较大程度地满足医疗需求，预期为适用人群带来的受益大于风险。

# 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：201800044）。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。

建议上市后在十家以上临床机构继续收集本产品临床使用数据，同时收集结肠镜和/或病理检查结果，或结直肠癌相关疾病随访结果，进一步评价本产品长期临床性能表现，以及进一步监测不良事件的发生。

2020年11月02日

**附件　产品说明书**

# KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测试剂盒（PCR 荧光探针法-胶体金法）说明书

【产品名称】

通用名称：KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测试剂盒（PCR 荧光探针法-胶体金法）

【包装规格】

48 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人粪便样本中的 KRAS 基因突变（包括但不区分 G12D、G12A、G12V、G12S、G12R、 G12C、G13D）、BMP3 和 NDRG4 基因甲基化及血红蛋白，各个指标的检测值通过“KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测分析软件”计算综合评分，用于对肠镜依从性差的结直肠癌高风险人群的筛查。综合评分大于或等于阳性判断值的样本为阳性，表示受检者体内可能有结直肠癌和/或进展期腺瘤，需要进一步接受肠镜检查；反之，如果综合评分低于阳性判断值，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。鉴于受试者为高风险人群，因此在必要时仍应建议进行肠镜检查。

该产品适用人群为年龄 40-74 岁的结直肠癌高风险人群（高风险人群判定参照中国结直肠肿瘤早诊筛查相关专家共识）。本产品不能替代肠镜，不能用于普通人群的肿瘤筛查，临床诊断过程中不应以本产品检测结果作为临床诊断的唯一依据。

【检测原理】

本试剂盒基于荧光 PCR 技术和胶体金技术，对粪便样本中可能含有的脱落肠道癌变细胞中的变异核酸物质及粪便中可能潜隐的血红蛋白进行检测。

基因检测部分：本试剂盒针对人类粪便 DNA 中的 KRAS 基因检测采用 TaqMan 探针与 ARMS 法相结合的方法，ARMS 特异性引物识别对应的突变位点，PCR 扩增放大，同时，利用 TaqMan 探针对扩增产物进行检测，结合高特异的热启动 Taq 酶及 PCR 反应程序可特异性区分最低一个碱基差异的突变，从而检测人类 KRAS 基因第二外显子 12 和 13 编码子上常见的 7 种突变类型。另外，多重 PCR 同时检测内参基因 ACTB，评估粪便人源 DNA 质量是否合格。

为了对 DNA 进行 BMP3 和 NDRG4 基因中 CpG 岛胞嘧啶甲基化的检测，需要将 DNA 经过亚硫酸盐处理，即经过硫化、脱氨基、脱硫等化学反应，使没有甲基化的胞嘧啶（C）转化为尿嘧啶（U），而已甲基化的胞嘧啶则不会发生转化，从而特异性地区分开甲基化和未甲基化的靶物。检测使用 TaqMan 荧光探针 PCR 技术，引物探针被设计为覆盖 BMP3 和 NDRG4 启动子附近的 CpG 位点并且特异性和发生甲基化而无法被化学转化的序列结合并产生 PCR 产物和信号，而与未发生甲基化即被转化后的序列不能结合。另外，同时检测转化

后 DNA 的内参基因 B2M（以上 3 个基因被标记上不同的荧光设置于不同的波长检测通道），评估粪便人源 DNA 质量是否合格。

血红蛋白检测部分：便隐血检测试剂（胶体金法）采用双抗体夹心法，含有被事先固定于膜上检测区（T）的抗人血红蛋白抗体和质控区（C）的羊抗鼠多克隆抗体。测试时，液体在毛细效应下向前层析。如样本中含有人血红蛋白，首先会和胶体金垫中的胶体金标记抗人血红蛋白抗体形成抗原-抗体复合物，进而通过检测区（T）时会被固定在检测区（T）抗人血红蛋白抗体所捕获，检测区（T）会出现一条紫红色条带，判定为阳性。如样本中不含有人血红蛋白，则检测区（T）将不会形成双抗夹心复合物，因此检测区（T）内将没有紫红色条带出现，则判定为阴性。无论人血红蛋白是否存在于样本中，质控区（C）内都会形成胶体金标记的鼠 IgG-羊抗鼠多克隆抗体的复合物，进而出现一条紫红色条带。质控区内（C）所显现的紫红色条带是判定层析过程是否正常的标准，同时也作为试剂的内控标准。

【主要组成成分】

本试剂盒由试剂Ⅰ、试剂Ⅱ、试剂Ⅲ和试剂Ⅳ组成。

试剂Ⅰ共有 5 个组分，分别为 KRAS 反应液 A、KRAS 反应液 B、KRAS 反应液 C、KRAS 阳性质控品和 KRAS 阴性质控品。

试剂Ⅱ共有 4 个组分，分别为甲基化反应液 A、甲基化反应液 B、甲基化阳性质控品和甲基化阴性质控品。

试剂Ⅲ共有 5 个组分，分别为变性液、转化液、柱结合液、DNA 纯化柱和洗脱液。

试剂Ⅳ共 1 个组分，为 1 测试/条便隐血检测试剂条。

不同批号试剂中各组分不可以互换。试剂组成成分详见表 1。

推荐样本处理及样本DNA提取试剂盒：杭州诺辉健康科技有限公司的粪便检验预处理装置（浙杭械备20160367号）和核酸提取或纯化试剂（浙杭械备20180059号）。

**表 1 试剂盒组成成分**

| 试剂盒组成 | 试剂组成 | 主要组分 | 规格 | 数量 |
|---|---|---|---|---|
| 试剂Ⅰ | KRAS 反应液 A | 引物、探针 | 0.7mL/管 | 1 |
| | KRAS 反应液 B | dNTP、缓冲液、热启动酶 | 0.7mL/管 | 1 |
| | KRAS 反应液 C | 超纯水 | 1.5mL/管 | 1 |
| | KRAS 阳性质控品 | 基因组 DNA | 0.05mL/管 | 1 |
| | KRAS 阴性质控品 | 基因组 DNA | 0.05mL/管 | 1 |
| 试剂Ⅱ | 甲基化反应液 A | 引物、探针 | 0.3mL/管 | 1 |
| | 甲基化反应液 B | dNTP、缓冲液、热启动酶、超纯水 | 0.9mL/管 | 1 |
| | 甲基化阳性质控品 | 基因组 DNA | 0.6mL/管 | 1 |
| | 甲基化阴性质控品 | 基因组 DNA | 0.6mL/管 | 1 |
| 试剂Ⅲ | 变性液 | NaOH | 0.6mL/瓶 | 1 |

| | | | | |
|---|---|---|---|---|
| | 转化液 | NaOH、NaHSO3、(NH4)2SO3·H2O、50%NH4HSO3 | 25mL/瓶 | 1 |
| | 柱结合液 | 盐酸胍、Na2HPO4、NaH2PO4 | 35mL/瓶 | 1 |
| | DNA 纯化柱（含收集管） | PP+硅胶膜 | 1 测试/管 | 48（2×48） |
| | 洗脱液 | 超纯水 | 3mL/瓶 | 1 |
| 试剂Ⅳ | 便隐血检测试剂条 | 抗人血红蛋白抗体、标记用抗人血红蛋白抗体、羊抗鼠多克隆抗体、硝酸纤维素膜、聚酯纤维素膜 | 1 测试/条 | 48 |

需要但未提供的材料：

微型离心机（Eppendorf），能离心1.5、2.0mL的离心管；

板式离心机（美国安胜科技有限公司），能离心PCR96孔板；

量程为2.5、10、20、100、200、1000μL的移液器（Eppendorf）；

恒温金属浴（杭州奥盛仪器有限公司）；

涡旋混匀器（Kylin-Bell）；

10、20、100、200、1000μL带滤芯吸头（Axygen）；

8联PCR反应管和8联PCR反应盖（Axygen）；

96孔板和96孔板密封膜（Life Technologies）；

1.5、2.0mL无菌、无核酸酶的EP管（Axygen）；

无水乙醇（天津市永大化学试剂有限公司）；

自配的1×PBS缓冲液（pH7.2~7.4 ）；

无菌、无核酸酶的超纯水（Invitrogen）。

备注：以上是经本公司验证过的设备和耗材，如用其他品牌或型号，请自行验证。

【储存条件及有效期】

1. 储存条件及有效期

试剂Ⅰ和试剂Ⅱ在-25～-15℃条件下避光存储，有效期为 12 个月；试剂Ⅲ在 2～8℃条件下避光存储，有效期为 12 个月。试剂Ⅳ在 2～30℃条件下避光存储，有效期为 12 个月。生产日期和使用期限见标签。

2. 开封有效期

试剂Ⅰ和试剂Ⅱ：开封后置-25～-15℃避光保存，有效期为 6 周，每管试剂冻融次数不得超过 5 次，应尽量避免反复冻融；试剂Ⅲ：开封后置 2～8℃避光保存，有效期为 2 周；试剂Ⅳ：开封后置 2～30℃避光保存，有效期为 4 周。

【适用仪器】

ABI7500 荧光定量 PCR 仪

【样本要求】

1. 样本类型：粪便样本，应避免水样粪便。

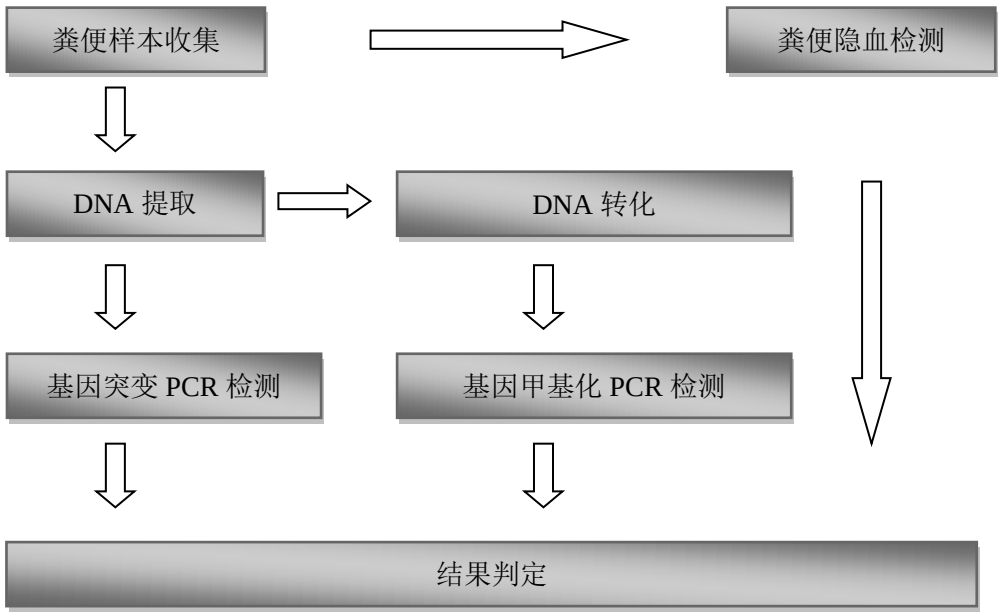
2. 样本采集：推荐使用杭州诺辉健康科技有限公司的粪便检验预处理装置（浙杭械备20160367号）进行粪便样本采集，使用预处理装置中自带的塑料取样勺取一勺粪便（相当于拇指第一关节大小，约5g），同取样勺一起放入样品管A内（注意：管内溶液不要倒掉！），取样后总容量不可超过25mL（样品管上有刻度标注）；取出样品管B（含干燥剂），拔出管盖，使用取样棒连续在粪便的5处不同部位穿刺采样，然后将管盖插回样品管B中盖紧。完成取样后，将两个样品管拧紧分别装入自封袋中，再装入绿色内盒，具体步骤见粪便检验预处理装置使用说明书。

3. 样本保存：使用粪便检验预处理装置（浙杭械备20160367号）采集的粪便样本建议在常温条件下保存不超过7天；若需长期保存，建议在-60℃以下储存且时间不超过1个月（仅针对样品管A）。提取后的DNA若长期保存建议在-25～-15℃储存且时间不超过6个月；转化后的DNA建议在-25～-15℃储存且时间不超过2.5个月；DNA反复冻融次数不超过3次。

4. 待检DNA要求：DNA浓度推荐为50～500ng/μL，DNA纯度推荐为$OD_{260/280}$为1.6~2.0。

【检验方法】

检测流程如下图所示：




1. 样本采集

按照粪便检验预处理装置（浙杭械备20160367号）说明书要求采集成型的粪便样本。

2. 样本DNA提取

推荐使用杭州诺辉健康科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（浙杭械备 20180059 号）进行粪便样本 DNA 提取，严格按照说明书操作。

3. DNA亚硫酸盐转化

实验前的准备：

a. 在样本制备区完成本部分操作；

b. 变性液为 15M 的 NaOH：使用前需要将变性液稀释成 3M 后使用；

c. 脱硫液（自配）：0.02M NaOH 的 90%乙醇溶液（NaOH 终浓度 0.02M，乙醇终浓度 90%）；

d. 90%乙醇需要新鲜配制：现配现用；

e．甲基化阳性质控品和阴性质控品需经过 DNA 亚硫酸盐转化后方能用于甲基化 PCR 检测。

4. DNA亚硫酸盐转化操作方法：

1）取 1.5mL 离心管，取 40μL 提取好的 DNA 溶液，加入 4μL 3M NaOH（即稀释后的变性液），42℃浴孵育 20min；

2）加入 200μL 转化液，混匀，50℃避光孵育 16 小时；

3）加入 550μL 柱结合液，混匀，转移至 DNA 纯化柱，13000rpm 离心 2min，弃废液后，再次空离心 3min，弃废液；注意在本步骤后，需更换新的收集管，并且若纯化柱内有液体残留，使用 10ul 枪头吸除残留液体。

4）加入 600μL 90%乙醇至 DNA 纯化柱，13000rpm 离心 2min，弃废液后，再次离心 15sec；

5）加入 300μL 脱硫液（0.02M NaOH 的 90%乙醇溶液），室温（15～30℃）放置 30min，13000rpm 离心 2min，弃废液；

6）加入 600μL 90%乙醇，13000rpm 离心 2min，弃废液，重复此步骤 1 次，之后再次空离心 3min；

7）DNA 纯化柱放入新 1.5mL 离心管中，加入 40μL 洗脱液，50℃烘箱或金属浴孵育 10min，13000rpm 离心 2min，得转化后的 DNA 溶液，-25～-15℃保存备用。

5. KRAS基因突变检测

实验前的准备：依次在试剂准备区完成溶液配制，在样本制备区完成加样，在扩增和产物分析区完成 PCR 扩增与分析。

1） 在超净工作台内，按照表 2 配制 PCR 反应体系；

**表 2 KRAS 突变检测体系**

| 组分 | 体积/反应 |
|---|---|
| KRAS 反应液 A | 11.2μL |
| KRAS 反应液 B | 12μL |
| KRAS 反应液 C | 24.8μL |

2） 混合均匀后分装反应孔中，每孔 48μL；

◆ 以上操作在试剂准备区完成

3）每个样本取 2μL DNA 至对应反应孔内，设无模板对照（NTC）即 2μL 超纯水、阳性、阴性质控品各一个反应。

◆ 以上操作在样本制备区完成

4）连接电源，依次打开 PCR 仪和电脑，将反应管（板）放入 PCR 仪；

5）电脑上依次选择 Start > Programs > Applied Biosystems >7500 Software 启动软件；

6）选择 New Experiment，进入 Experiment Properites，输入检测名称，并设定为 7500(96 wells)、

Quantitation-Standard Curve、TaqMan®Reagents、Standard(~2 hours to complete a run)；

7）选择 Plate Setup，在 Define Targets and Sample 选项卡中设置检测基因和荧光标记，分别为：KRAS（FAM, None）、ACTB(CY5，None)，设置样品名称(Sample Name)；在 Assign Targets and Sample 选项卡中设置对应的反应孔信息，Select the dye to use as the passive reference 下选择 ROX；

8）选择 Run Method，按照 50μL 反应体系，按照图 1 说明进行反应条件设置；

反应体积：50 μL

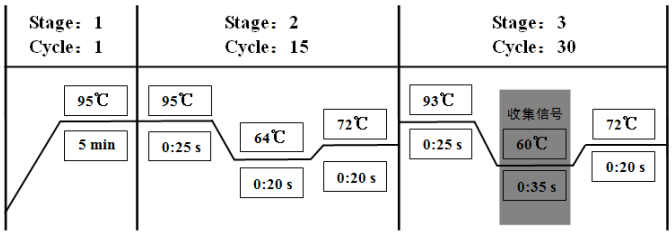



**图 1 KRAS 突变检测 PCR 反应条件**

9）其他选项默认，点击 RUN 运行程序；

10）PCR 反应程序结束后，使用 2 层 PE 手套包好 PCR 反应条或 96 孔板，避免 PCR 管盖打开或膜破裂造成污染，并按生物垃圾处理，严禁打开 PCR 管盖，以免造成污染。

◆ 以上操作在扩增和产物分析区完成

6. BMP3/NDRG4基因甲基化检测（与KRAS基因突变检测在不同96孔板进行）

1） 在超净工作台内，按照表 3 配制 PCR 反应体系；

**表 3 甲基化检测体系**

| 组分 | 体积./反应 |
|---|---|
| 甲基化反应液 A | 3.85μL |
| 甲基化反应液 B | 14.15μL |

2） 混合均匀后分装反应孔中，每孔 18μL；

◆ 以上操作在试剂准备区完成

3）每个样本取 2μL 转化后的 DNA 至对应反应孔内，设无模板阴性对照（NTC）即 2μL 超纯水、阳性、阴性质控品各一个反应；

◆ 以上操作在样本制备区完成

4）连接电源，依次打开 PCR 仪和电脑，将反应管（板）放入 PCR 仪；

5）电脑上依次选择 Start > Programs > Applied Biosystems >7500 Software 启动软件；

6）选择 New Experiment，进入 Experiment Properites，输入检测名称，并设定为 7500(96 wells)、Quantitation-Standard Curve、TaqMan®Reagents、Standard(~2 hours to complete a run)；

7）选择 Plate Setup，在 Define Targets and Sample 选项卡中设置检测基因和荧光标记，分别为：BMP3（VIC，None）、NDRG4(FAM，None)、B2M(TAM，None)，设置样品名称(Sample Name)；在 Assign Targets and Sample 选项卡中设置对应的反应孔信息，Select the dye to use as the passive reference 下选择 ROX；

8）选择 Run Method，按照 20μL 反应体系，按照图 2 说明进行反应条件设置；

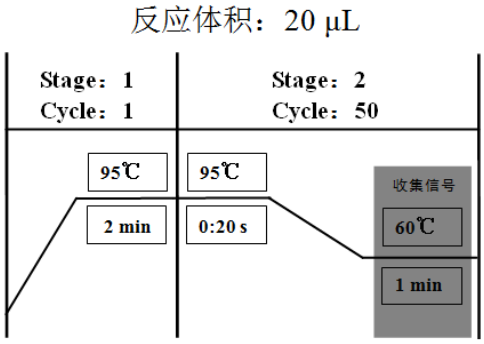



**图 2 甲基化检测 PCR 反应条件**

9）其他选项默认，点击 RUN 运行程序；

10）PCR 反应程序结束后，使用 2 层 PE 手套包好 PCR 反应条或 96 孔板，避免 PCR 管盖打开或膜破裂造成污染，并按生物垃圾处理，严禁打开 PCR 管盖，以免造成污染。

◆ 以上操作在扩增和产物分析区完成

7. 便隐血检测

1）取出样本管，加入 1.5mL 1×PBS 缓冲液，振荡，让样本充分溶解；取 500ul 上清稀释 1 倍后混匀备用；

2）取出试纸条，将试剂箭头所指的一端浸入样本溶液中。注意：样本液面不能超过试剂条的 MAX 标记线；

3）等待紫红色条带出现，检测结果应该在 5min 时判读，10min 后判读无效。

8. 软件分析及结果判定

根据上述各项结果，将基因突变检测内参基因 ACTB 对应 Ct 值（CY5）、靶基因 KRAS 对应 Ct 值（FAM）、基因甲基化检测内参基因 B2M 对应 Ct 值（TAMRA）、靶基因 BMP3 对应 Ct 值（VIC）、靶基因 NDRG4 对应 Ct 值（FAM）以及便隐血（FOBT）检测结果（阳性结果选择 Positive，阴性结果选择 Negative，无效结果选择 Invalid）输入“KRAS 基因突变及 BMP3/NDRG4 基因甲基化和便隐血联合检测分析软件（version1.0）”中相应位置，点击“计算”得出综合评分，并根据设定阈值（Cut-off）进行结果判定。

【阳性判断值】

1. 当P值＜165时，该样本的检测结果为阴性，不排除该样本含阳性靶标但浓度低于本试剂盒的检测下限。
2. 当P值≥165时，该样本的检测结果为阳性，建议通过结肠镜或其他临床诊断方法进一步确诊。
3. 当P值为Invalid时，该样本检测结果不合格，需重新采样。

【检验结果的解释】

1. KRAS基因突变检测

1）Ct 值的确定：自动设置基线，同时选择阳性质控品和阴性质控品反应孔、NTC 反应孔和样品反应孔。手动设置阈值线，用户可根据实际情况调节阈值线至扩增曲线升起的拐点处，得到 Ct 值；

2）NTC 分析：任一 NTC 管的 FAM 信号都应无明显扩增曲线，否则本次实验结果无效，建议排除污染

后重新做一次。若 NTC 管的 CY5 信号偶有升起，此属正常现象，不影响突变检测结果的判断；

3）质控品分析：阳性质控品的 FAM 和 CY5 信号均应有明显的扩增曲线：FAM 信号 Ct 值一般小于 24，波动范围为 15～24，CY5 信号 Ct 值一般小于 18，波动范围为 12～18；阴性质控品的 FAM 信号的线形为直线或轻微斜线，无明显指数增长期，CY5 信号 Ct 值一般小于 18，波动范围为 12～18；

4）样本检测：

a. 靶基因 KRAS 分析：样本的 FAM 信号对应 Ct 值范围在 5-30 之间变化，若 Ct 值<5 则说明样本上样量太高或扩增曲线异常，可用洗脱液（Ultrapure Distilled water，货号 10977，英潍捷基（上海）贸易有限公司）稀释后重新检测；

b. 内参基因 ACTB 分析：每个样本的内参 CY5 信号都应升起且 Ct 值<25，若内参 CY5 信号不起线则不能继续实验，说明加入的 DNA 含有 PCR 抑制剂或 DNA 加入量不够，需要重新提取 DNA 或增加 DNA 用量后重新检测；

2. BMP3/NDRG4基因甲基化检测

1）Ct 值的确定：自动设置基线，同时选择阳性质控品和阴性质控品反应孔、NTC 反应孔和样品反应孔。手动设置阈值线，用户可根据实际情况调节阈值线至扩增曲线升起的拐点处，得到 Ct 值；

2）NTC 分析：任一 NTC 管的 FAM 和 VIC 信号都应无明显扩增曲线，否则本次实验结果无效，建议排除污染后重新做一次。若 NTC 管的 TAM 信号偶有升起，此属正常现象，不影响甲基化检测结果的判断；

3）质控品分析：阳性质控品的 FAM、VIC 和 TAM 信号均应有明显的扩增曲线：FAM 和 VIC 信号 Ct 值一般小于 38，波动范围为 32～38，TAM 信号 Ct 值一般小于 35，波动范围为 30～35；阴性质控品的 FAM 和 VIC 信号的线形为直线或轻微斜线，无明显指数增长期，TAM 信号 Ct 值一般小于 35，波动范围为 30～35；

4）样本检测：

a. 靶基因 BMP3 和 NDRG4 分析：样本的靶基因 NDRG4 的 FAM 信号和 BMP3 的 VIC 信号 Ct 值范围在 20-50 之间变化，若 Ct 值<20 则说明样本上样量太高或扩增曲线异常，可用洗脱液（Ultrapure Distilled water，货号 10977，英潍捷基（上海）贸易有限公司）稀释后重新检测；

b. 内参基因 B2M 分析：每个样本的内参 TAM 信号都应升起且 Ct 值<42，若内参 TAM 信号不起线则不能继续实验，说明加入的 DNA 含有 PCR 抑制剂或 DNA 加入量不够，需要重新提取 DNA 或增加 DNA 用量后重新检测；

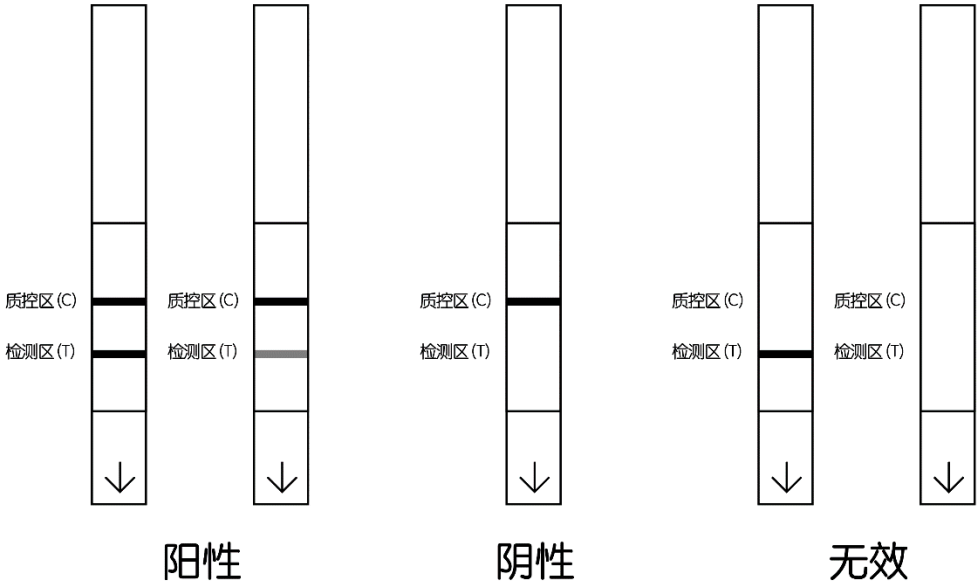
3. 便隐血检测

1）阳性（+）：两条紫红色条带出现，一条位于检测区（T）内，另一条位于质控区（C）；

2）阴性（-）：仅质控区（C）出现一条紫红色条带，在检测区（T）内无紫红色条带出现；

3）无效：质控区（C）未出现紫红色条带，表明不正确的操作过程或试剂已变质损坏；

4）根据便隐血检测阴阳性结果进行判定，对软件中的FOBT进行赋值，阳性结果赋值为Positive，阴性结果赋值为Negative，无效结果赋值为Invalid。




【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒检测结果仅作为临床诊断辅助手段之一，仅供临床参考。受检者如因非肠道肿瘤或癌前病变原因出现便血（比如内痔、外痔），有可能得出假阳性结果，因此需要对患者的临床诊治结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 可能由于样本损坏等原因无法测定而需要重新收集样本。

3. 本试剂盒对结直肠癌和进展期腺瘤均存在漏检风险，尤其对进展期腺瘤漏检风险较大，检测阴性样本应考虑其他临床表现和高危因素以确定是否采取进一步的检测或治疗手段。

4. 该产品不能替代肠镜。对于高风险患者，如果检测结果阴性，不能免于后续肠镜检查。

5. 在临床试验的准确性验证部分，针对KRAS突变，阳性样本覆盖本产品适用的7种突变型，其中G12A、G12S、G12R突变因阳性率低，纳入阳性例数较少。

【产品性能指标】

1. 外观

外观整齐、组分齐全、液体组分无渗漏。

2. 阴性符合率

1）KRAS 基因突变检测

使用本试剂盒对 KRAS 基因突变阴性参考品和特异性参考品进行检测，结果应为 KRAS 基因突变-无扩增；

2）BMP3/NDRG4 基因甲基化检测

使用本试剂盒对 BMP3/NDRG4 基因甲基化阴性参考品和特异性参考品进行检测，结果应为 BMP3/NDRG4 基因甲基化-无扩增；

3）便隐血检测

使用本试剂盒对便隐血阴性参考品和特异性参考品进行检测，结果应为便隐血阴性。

4）临床阴性样本检测

检测 10 份金标准结肠镜和/或病理结果为阴性的临床阴性样本，结果应为试剂盒联合检测阴性。

3. 阳性符合率

1）KRAS 基因突变检测

使用本试剂盒对 KRAS 基因突变阳性参考品进行检测，结果应满足 KRAS 基因突变阳性参考品 Ct 值范围要求；

2）BMP3/NDRG4 基因甲基化检测

使用本试剂盒对 BMP3/NDRG4 基因甲基化阳性参考品进行检测，结果应满足 BMP3/NDRG4 基因甲基化阳性参考品 Ct 值范围要求；

3）便隐血检测

使用本试剂盒对便隐血阳性参考品进行检测，结果应为便隐血阳性。

4）临床阳性样本检测

检测 25 份金标准结肠镜和/或病理结果为阳性的临床样本，结果应为试剂盒联合检测阳性。

4. 精密度

1）KRAS 基因突变检测

使用本试剂盒对 KRAS 基因突变精密度参考品进行检测，结果应满足 KRAS 基因突变精密度参考品 Ct 值范围要求且相应检测通道 Ct 值的变异系数（CV）≤5.0%；

2）BMP3/NDRG4 基因甲基化检测

使用本试剂盒对 BMP3/NDRG4 基因甲基化精密度参考品进行检测，结果应满足 BMP3/NDRG4 基因甲基化精密度参考品 Ct 值范围要求且相应检测通道 Ct 值的变异系数（CV）≤5.0%。

3）便隐血检测

使用本试剂盒对便隐血精密度参考品进行检测，结果应为便隐血阳性，使用标准比色卡读数，读数结果上下限之差不得超出比色卡一个档次。

5. 最低检测限

1） KRAS 基因突变检测

使用阴性粪便样本池做为样本背景基质，分别添加不同比例的含各突变型和野生型 KRAS 基因的细胞 DNA 混匀后，进行最低检测限研究，结果表明：本试剂盒最低可在 10ng 人基因组 DNA 的背景下检测出不低于 1% KRAS 基因突变；

2）BMP3/NDRG4 基因甲基化检测

使用阴性粪便样本池做为样本背景基质，添加不同比例的含甲基化和未甲基化 BMP3/NDRG4 基因的细胞 DNA 混匀后，进行最低检测限研究，结果表明：本试剂盒最低可在 10ng 人基因组 DNA 的背景下检测出不低于 1% BMP3/NDRG4 基因甲基化；

3）便隐血检测

本试剂盒最低可检测不低于 100ng/mL 人血红蛋白。

6. 临床准确性验证

针对KRAS突变，以结直肠癌患者组织样本PCR核酸检测结果为对照，本产品与对比方法的阳性符合率89.5%，阴性符合率94.7%，阳性样本覆盖本产品适用的7种突变型，其中G12A、G12S、G12R突变因阳性率低，纳入阳性例数较少。

在临床试验的准确性验证部分，针对 BMP3 基因甲基化，以结直肠癌患者组织样本一代测序结果为对照，本产品与对比方法的阳性符合率 92.1%，阴性符合率 98.0%。

在临床试验的准确性验证部分，针对 NDRG4 基因甲基化，以结直肠癌患者组织样本一代测序结果为对照，本产品与对比方法的阳性符合率 95.9%，阴性符合率 97.0%。

7. 临床性能

1）通过八家中心 4,758 例临床试验证实，本试剂盒对结直肠癌的灵敏度为 95.5%，对进展期腺瘤的灵敏度为 63.5%，特异性为 87.1%。

2）本试剂盒在临床试验中对前瞻性样本检测结直肠癌的灵敏度为 91.9%。

【注意事项】

1. 开始检测前请仔细阅读本说明和相应说明书，并严格按照要求执行。

2. 本试剂盒结果会受到样本本身的来源、样本采集、样本质量、样本运输条件、样本处理等因素的影响，同时也受到DNA提取质量、荧光定量PCR仪型号、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果，使用者须了解检测过程中的潜在错误、准确性的局限性。

3. 为了避免样本中任何潜在的生物危害，检测样本应视为具有传染风险物质，操作过程须有相应的防护措施，避免接触到皮肤和粘膜，检测完成的废弃物须按生物污染物处理程序处理。

4. 单包装破损、标识不清、超过有效期的试剂，请勿使用。

5. 避免阳性对照交叉污染或NTC污染，推荐操作过程中使用单独、专用的设备及耗材，并严格区分阳性对照和反应试剂的使用，防止污染试剂，造成假阳性。

6. 样本完成核酸提取以及提取的DNA经亚硫酸盐转化后，建议立即进行下一步实验，否则放入-25～-15℃保存，应避免反复冻融。

7. PCR反应液分装时尽量避免产生气泡，加样时应使样本完全落入反应液中，不应有样本黏附于管壁上，加样后应尽快盖紧盖管，上机前离心反应管，检查密封完好，避免污染仪器。

8. 本试剂盒的所有成分经过严格配制，更改或更换会导致最终结果无效。不同批号试剂盒成分不可相互混用。

9. 实验室管理应严格按照国家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。实验人员必须进行专业培训。

10. 实验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染。

11.实验用消耗品（如离心管、吸头等）应有合理的清洁和质检程序，避免DNA酶污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。

12.本试剂盒仅用于体外诊断，不作其他临床用途。

13.本试剂盒仅适用于粪便样本和指定的适用机型。

14.生产批号、有效期见外包装。

15.试剂Ⅳ检测结果不受浓度低于以下水平物质的干扰：猪血红蛋白（0.5mg/mL）、牛血红蛋白（0.5mg/mL）、鸡血红蛋白（0.5mg/mL）、羊血红蛋白（0.5mg/mL）、兔血红蛋白（0.5mg/mL）、辣根过氧化物酶（2mg/mL）、肌红蛋白（1μg/mL）、维生素C（20mg/dL）、维生素B1（20mg/dL）、小柴胡（500mg/mL）、叶酸亚铁片（500mg/mL）不会对检测结果干扰造成假阳性结果的出现；且与最低检测限水平人血红蛋白同时存在时，不会因竞争抑制导致假阴性结果的发生。

16.试剂Ⅳ为一次性用品，使用后的试剂样本等废弃物应按照国家相关规定妥善处理。

17.试剂Ⅳ在检测前需将检测试剂恢复至室温（15-30℃）后进行检测。

【参考文献】

[1] Melotte, V, Lentjes, MHFM, van den Bosch SM, et al. 2009. N-Myc Downstream-Regulated Gene 4 (NDRG4)：A Candidate Tumor Suppressor Gene and Potential Biomarker for Colorectal Cancer V, JNCI J Natl Cancer Inst,Volume101, Issue13.916-927.

[2] Zou H, Harrington JH, Abdirashid M, et al. 2007. Highly Methylated Genes in Colorectal Neoplasia：Implications.

[3] miRBase Sequence database, release 13.0. ftp：//ftp.sanger.ac.uk/pub/mirbase/sequences/.

[4] Ahlquist DA, Zou H, Domanico M, et al. 2010. Next generation stool DNA testing for detection of colorectal neoplasia：early marker evaluation. Presented at American Association of Cancer Research. Oct.29, 2010, Philadelphia, PA.

[5] Leo G.M. van Rossum1*, Anne F. van Rijn2, et al. False negative fecal occult blood tests due to delayed sample return in colorectal. cancer screening Int. J. Cancer：125, 746–750 (2009) .

[6] Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi. Comparison between application of fecal occult blood quantitive testing instrument and colloidal gold strip method in colorectal cancer screening. 2013 Aug;47(8)：74751.

[7] Huang Y, et al. Predictive power of quantitative and qualitative fecal immunochemical tests for hemoglobin in population screening for colorectal neoplasm. Eur J Cancer Prev. 2014 Jan;23(1) .

【基本信息】

注册人/生产企业名称：杭州诺辉健康科技有限公司

住所：浙江省杭州市滨江区长河街道江二路400号2幢13层1313室

生产地址：

杭州市滨江区长河街道长河路475号2幢2层201室

杭州市滨江区长河街道江二路400号2幢1层101、102、103、104、105、107、108室

杭州市滨江区长河街道江二路400号1幢1层102室（仓库地址）

联系方式：400-826-2300；传真：0571-86430935

售后服务单位名称：杭州诺辉健康科技有限公司

联系方式：400-826-2300；传真：0571-86430935

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：