

受理号：CSZ2400141

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称： 人 ZNF154 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别： 第三类

申请人名称： 安徽达健医学科技有限公司

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.....	11
综合评价意见.....	13

基本信息

一、申请人名称

安徽达健医学科技有限公司

二、申请人住所

芜湖经济技术开发区东区 9#厂房(中科芜湖科技园公司内)

三、生产地址

芜湖经济技术开发区东区 9#厂房(中科芜湖科技园公司内)

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

试剂盒包含：EC PCR 反应预混液、EC PCR 引物探针混合液、EC 阳性对照品、EC 阴性对照品，详见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

组分	主要成分	体积
1.EC PCR 反应预混液	DNA 聚合酶、dNTPs、氯化镁和缓冲液	750 μ L \times 1 管
2.EC PCR 引物探针混合液	人工合成的寡核苷酸引物片段、分别用 FAM 和 VIC 标记的寡核苷酸探针	300 μ L \times 1 管
3.EC 阳性对照品	人食管癌细胞系(KYSE-140)DNA	100 μ L \times 1 管
4.EC 阴性对照品	正常人白细胞 DNA	100 μ L \times 1 管

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测人食管粘膜脱落细胞中 ZNF154 基因甲基化状态。

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。

(三) 产品包装规格

48 人份/盒

(四) 产品检验原理

本试剂盒采用 PCR 结合生物芯片检测技术，基于油包水微滴生成原理，读取每个微滴在 FAM (ZNF154 基因甲基化探针) 与 VIC (ZNF154 基因非甲基化探针) 荧光通道下的荧光强度并计数；然后对荧光数据进行分析，从而确定检测样本的 ZNF154 基因的甲基化百分比。

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 EC PCR 反应预混液、引物和探针等。这些原材料均是通过外购的方式获得。

其中引物、探针的序列由申请人自行设计，由合成公司经过合成、修饰、纯化而获得。

申请人对主要原材料的供应商进行了选择，筛选出合格供应商并确定，制定了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、重复性参考品以及最低检测限参考品。

企业参考品的主要原材料为细胞株，食管癌脱落细胞 DNA 等样本。阳性参考品 EC-P1~EC-P12，为不同 DNA 浓度下 ZNF154 基因不同甲基化比例的样本。阴性参考品 EC-N1~ EC-N5，为正常人白细胞基因组 DNA、正常人食管脱落细胞及其他癌症组织 DNA 的样本。重复性参考品 EC-J1~ EC-J5，为不同 DNA 浓度下 ZNF154 基因不同甲基化比例的样本及阴性样本。最低检测限参考品 EC-S1~ EC-S2，为不同 DNA 浓度下检出限水平甲基化比例的样本。

本试剂盒同时设置了阳性对照和阴性对照，原料为人食管癌细胞系或正常人白细胞，用于检测过程中的质量控制。

(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、PCR 反应预混液用量的确定、PCR 模板体积的确定等；对 PCR

反应条件的研究包括退火温度及时间、预变性温度及时间、变性时间、循环数等。通过功能性实验，确定了最佳反应体系。

申请人对试剂盒中各个组分的主要生产工艺进行了研究，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度、精密度、最低检测限、分析特异性，配合使用的核酸提取试剂及亚硫酸氢盐转化试剂的性能评估。

准确度研究中，在适用机型上分别使用三批试剂盒，对若干临床样本的检测准确性进行研究，研究结果显示试剂盒检测结果与测序结果的阳性符合率、阴性符合率均为 100%。

精密度研究中，在适用机型上分别使用三批试剂盒，采用人食管癌细胞系及临床样本，由两位操作者进行连续 20 天的检测。结果显示试剂盒的批内、日间、批间、仪器、人员和地点间的检测变异系数均小于等于 10%。

最低检测限研究中，在适用机型上分别进行确定及验证。以阴性食管粘膜脱落细胞 DNA 样本为基质，采用不同浓度、不同甲基化比例的梯度稀释 DNA 样本，每个浓度梯度的样本检测 20 次进行最低检测限的确定。然后使用三个批次的试剂盒，采用多例最低检测限浓度水平的临床样本进行最低检测限的验证。

结果表明试剂盒的最低检测限为：在核酸浓度为 0.625ng/ μ L 时，本试剂盒可检出 4% 甲基化比例的 ZNF154 基因。

分析特异性研究包括交叉反应和干扰研究。

交叉反应结果表明，本产品检测转化前的食管脱落细胞样本、食管癌其它常见基因甲基化样本、食管黏膜良性病变、胃黏膜良性病变、食管癌前病变样本，其它恶性肿瘤食管脱落细胞样本（口腔癌、喉癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、胆囊癌），结果均未出现交叉反应。

干扰研究结果表明，食管脱落细胞样本中含有以下内源及外源干扰物质：胆红素（0.20mg/mL）、胆固醇（5mg/mL）、血红蛋白（100mg/mL）、甘油三酯（1.5mg/mL），食物残渣中动物 DNA（500ng/ μ L）、植物 DNA（500ng/ μ L）、植物油（10.00 μ L/mL），常见细菌大肠杆菌（ 10^6 cfu/mL）、金黄色葡萄球菌（ 10^6 cfu/mL），常用食管或胃疾病药物雷尼替丁（1.2mg/mL）、埃索美拉唑（10.6mg/mL）、吗丁啉（0.14mg/mL）、斯达舒（6.84mg/mL）、红细胞（0.4% v/v）、血清白蛋白（80g/L）、胃酸（0.5% v/v）、口腔菌群（包括链球菌、酵母菌、葡萄球菌）（ 10^6 CFU/mL）、胶囊外皮（200mg）对检测结果无影响。青霉素（2.56mg/mL）对检测结果有影响，因此建议患者取样前暂停服用该药 1 天后再采集样本。

申请人采用食管粘膜脱落细胞样本进行了核酸提取试剂及亚硫酸盐转化试剂的性能研究，结果表明配合使用的核酸提取试剂及亚硫酸盐转化试剂的性能符合要求。

(四) 阳性判断值研究

阳性判断值研究分为建立和验证两部分，共入组有效性病例样本 300 例，包括食管癌患者、食管良性疾病、消化道其它良性疾病和消化道其它肿瘤等。

申请人根据检测结果计算样本 ZNF154 基因甲基化率，通过 ROC 曲线分析确定试剂盒的阳性判断值为 4%。即样本 ZNF154 基因甲基化率 $\geq 4\%$ 时，样本检测结果为阳性；样本 ZNF154 基因甲基化率 $< 4\%$ 时，样本检测结果为阴性。

(五) 稳定性研究

申请人对产品的稳定性研究包括货架效期稳定性、运输稳定性、使用稳定性（包括开瓶稳定性、冻融稳定性）及样本稳定性。

货架有效期稳定性：将三批试剂盒置于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 下保存，分别在 0 个月、2 个月、4 个月、6 个月、8 个月、12 个月和 13 个月使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果显示试剂盒在生产后保存至 13 个月的各项性能指标均符合产品技术要求，故将产品有效期确定为 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存，有效期 12 个月。

此外，申请人对产品的运输稳定性、使用稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示产品的性能均能满足产品说明书的声称。

三、临床评价概述

在中山大学肿瘤防治中心、河南省肿瘤医院、安阳市肿瘤医院和山东第一医科大学附属肿瘤医院共 4 家临床机构进行了临床试验，样本类型为食管粘膜脱落细胞，入选受试者为疑似食管癌感染的人群。临床试验包括三部分。

第一部分，试验体外诊断试剂与临床参考标准的比对研究，临床试验共纳入 1462 例患者，其中食管癌患者 656 例，包括各分期、不同部位和不同病理分型等的食管癌患者，其他非食管癌疾病的患者 806 例，包括易发生干扰和交叉反应的各种良性疾病和肿瘤患者等。结果显示，试验体外诊断试剂的临床灵敏度为 91.46% (95%CI: 89.08%, 93.37%)，临床特异度为 90.82% (95%CI: 88.63%, 92.62%)。

第二部分，试验体外诊断试剂与临床参考方法(一代测序)的比对研究。临床试验共纳入 340 例样本，其中阳性样本 190 例，阴性样本 150 例。结果显示，试验体外诊断试剂与一代测序的阳性符合率为 99.47% (95%CI: 97.08%, 99.91%)，阴性符合率为 96% (95%CI: 91.55%, 98.15%)。

第三部分，采用试验体外诊断试剂进行的同一患者术前术后样本的研究。45 例手术前的试验体外诊断试剂检测为阳性的食管癌患者的术后样本，44 例检测为阴性，1 例检测为阳性，其中检测为阳性的样本为复发患者。上述结果说明，试验体外诊断试剂所检标志物为食管癌特异性标志物。

综上，试验体外诊断试剂的临床试验结果满足临床使用要求，符合技术审评要求。

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》对人 ZNF154 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 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。该产品体外定性检测人食管粘膜脱落细胞中甲基化的 ZNF154 基因，用于临床医师建议做食管镜检测，但因病人依从性差或其它医学原因无法做食管镜检测患者的辅助诊断，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. 与预期用途有关的风险，例如本产品不能作为食管癌早期诊断或确诊的依据，临床医生应结合其它诊断方法进行综合诊断。本产品不能替代胃镜，不能用于筛查，阴性结果不能完全排除食管癌。
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，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材料进行系统评价，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。

2025 年 10 月 11 日

附件：产品说明书

人 ZNF154 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：人 ZNF154 基因甲基化检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

48 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人食管粘膜脱落细胞中 ZNF154 基因甲基化状态。

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。

【检验原理】

本试剂盒采用 PCR 结合生物芯片检测技术，基于油包水微滴生成原理，读取每个微滴在 FAM（ZNF154 基因甲基化探针）与 VIC（ZNF154 基因非甲基化探针）荧光通道下的荧光强度并计数；然后对荧光数据进行分析，从而确定检测样本的 ZNF154 基因的甲基化百分比。

【主要组成成分】

组分	主要成分	体积
1.EC PCR 反应预混液	DNA 聚合酶、dNTPs、氯化镁和缓冲液	750 μ L \times 1 管
2.EC PCR 引物探针混合液	人工合成的寡核苷酸引物片段、分别用 FAM 和 VIC 标记的寡核苷酸探针	300 μ L \times 1 管
3.EC 阳性对照品	人食管癌细胞系(KYSE-140)DNA	100 μ L \times 1 管
4.EC 阴性对照品	正常人白细胞 DNA	100 μ L \times 1 管

注：需要自备的仪器、试剂及耗材；不同批号试剂盒中各组分不可互换。

- (1) 安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(通用型)(皖芜械备 20190002 号)；
- (2) 安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(离心柱型)(皖芜械备 20200003 号)或广州达健生物科技有限公司生产的甲基化检测样本前处理试剂盒(粤穗械备 20240006)；
- (3) 通用耗材、试剂和仪器：去离子水、带滤芯枪头(10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)、冰盒、1.5mL 离心管等。

【储存条件及有效期】

1. 试剂盒-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 储存，有效期 12 个月。
2. 避免反复冻融(不超过 5 次)，在第一次使用后，试剂可在 2~8 $^{\circ}$ C 储存 1 天，在-20 \pm 5 $^{\circ}$ C 可在有效期内储存 30 天。
3. 生产日期、有效期至见标签。

【适用仪器】

1. 广东永诺医疗科技有限公司生产的样本制备仪 MicroDrop-100A (备案号：粤禅械备 20190099 号)、生物芯片分析仪 MicroDrop-100B (注册证编号：粤械注准 20202221238；有效期至：2030-08-16)，杭州朗基科学仪器有限公司生产的 PCR 扩增仪 A300 (注册证编号：浙械注

准 20152220543；有效期至：2030-02-20）。

2. 新羿制造科技（北京）有限公司生产的样本制备仪 Drop Maker M1（备案号：京昌械备 20200025）、生物芯片分析仪 Chip Reader R1（注册证编号：京械注准 20192220517；有效期至：2029-08-29），杭州朗基科学仪器有限公司生产的 PCR 扩增仪 A300（注册证编号：浙械注准 20152220543；有效期至：2030-02-20）。

【样本要求】

1. 样本类型：适用于食管脱落细胞样本。建议使用安徽达健医学科技有限公司生产的“一次性使用采样器（皖芜械备 20200025）”采集食管脱落细胞。

2. 样本保存：采集后样本在常温下保存 3 天，2~8℃条件下保存 8 天。预处理后样本在-20±5℃条件下保存 12 个月。

3. DNA 提取：

推荐使用安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（通用型）（皖芜械备 20190002 号）提取样本 DNA。提取后的 DNA 可在-20±5℃保存不超过 6 个月。

4. 亚硫酸氢盐转化

推荐使用安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（离心柱型）（皖芜械备 20200003 号）或广州达健生物科技有限公司生产的甲基化检测样本前处理试剂盒（粤穗械备 20240006）处理样本 DN

A. 获取的 Bis-DNA 应立即用于后续实验, 或者 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存不超过 3 天。

【检验方法】

一、样本预处理

将含有食管脱落细胞的保存液离心, 小心去上清, 留少许保存液重悬沉渣后转移至 EP 管。

二、DNA 提取

推荐使用安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (通用型) (皖芜械备 20190002 号), 按该试剂盒说明书要求选取 500 μL 预处理后的食管脱落细胞悬液提取样本 DNA。

三、亚硫酸氢盐转化

推荐使用安徽达健医学科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂 (离心柱型) (皖芜械备 20200003 号) 或广州达健生物科技有限公司生产的甲基化检测样本前处理试剂盒 (粤穗械备 20240006), 按试剂盒说明书要求将 45 μL 样本 DNA (若提取的 DNA 样本浓度高于 45 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 用 TE 缓冲液稀释至 45 $\text{ng}/\mu\text{L}$, 适当进行稀释, 使 DNA 总投入量为 2 μg ; 低于 45 $\text{ng}/\mu\text{L}$ 样本则取 45 μL 参与转化) 处理成 Bis-DNA。

四、PCR 检测

(一) 广东永诺医疗科技有限公司生产的仪器的检验方法

1. 反应体系的配制

试剂	用量/检测次 (μL)
----	--------------------------

EC PCR 反应预混液	10
EC PCR 引物探针混合液	4
去离子水	2
Bis-DNA 样本	4
总体积	20

2. 制备微液滴

(1) 将微液滴生成芯片置于芯片卡座中，向油相孔加入 50 μ L 微液滴生成油，向样本孔中加入 20 μ L 已加入样本的 PCR 反应水相。待油相和水相加入完成后，盖上微液滴生成芯片密封垫，将微液滴生成芯片置于 MicroDrop -100A 样本制备仪中进行微液滴生成；

(2) 待微液滴生成后，依次小心将生成的微液滴全部转移至 96 孔 PCR 反应板中；

(3) 待微液滴转移至 96 孔 PCR 反应板后，盖上 96 孔板可穿刺热封膜，置于预热好的热封仪上进行封膜（封膜机设置：190 $^{\circ}$ C，5 秒）；封好膜之后应于 30 分钟内进行 PCR 扩增，或者放于 4 $^{\circ}$ C 冰箱 4 小时之内进行 PCR 扩增；

3. PCR 扩增

将反应板放入 PCR 扩增仪中进行扩增，按以下程序进行扩增反应。

温度及反应时间	循环程序	注意
95 $^{\circ}$ C 10min	1 cycle	升降温度 \leq 2 $^{\circ}$ C
94 $^{\circ}$ C 30s	45 cycles	
56 $^{\circ}$ C 60s		
98 $^{\circ}$ C 10min	1 cycle	
4 $^{\circ}$ C	forever	

4. 微液滴检测步骤、结果分析和参数设置，严格按照该产品使用说明书操作。

计算甲基化率：点击“导出数据”，可将实验结果原始数据导出成 word 文件，根据 FAM/VIC 通道的拷贝数信息计算甲基化率：

甲基化率=甲基化拷贝数(FAM 拷贝数) / [甲基化拷贝数(FAM 拷贝数)+非甲基化拷贝数(VIC 拷贝数)]×100%。

(二) 新羿制造科技（北京）有限公司生产的仪器的检验方法

1. 液体生成油体系制备

- (1) 取出样本制备通用试剂盒，将微液滴生成芯片装在适配件。
- (2) 油相溶液槽加入 180 μ L 生成油，水相溶液槽加入 30 μ L 水相体系（配制体系见表 1），并用密封盖封紧。
- (3) 取出 EC PCR 反应预混液、EC PCR 引物探针混合液，冰上融化。
- (4) 根据所需样本数量按照表 1 配制 PCR 反应体系，将 26 μ L/孔的混合试剂分装至八联排管中，再加入 4 μ L/孔的亚硫酸氢盐转化后纯化的 Bis-DNA 样本。

表 1 水相溶液反应体系的配制

试剂	用量/检测次 (μ L)
EC PCR 反应预混液	15
EC PCR 引物探针混合液	6
去离子水	5

Bis-DNA 样本	4
总体积	30

- (5) 打开机器上盖，将八联排管放入相应的位置。
- (6) 将适配件插入到制备仪相应的位置，压下把手，盖上机器盖板，运行仪器。
- (7) 点击【开始运行】启动样本制备，待进度显示完成后，打开机器盖板，掀开把手，将芯片适配件取出，将八联排管封盖并取出，完成本次样本制备。

2. PCR 扩增

将八联排管放入 PCR 仪，按以下程序进行设置。

温度及反应时间	循环程序	注意
95°C 10min	1 cycle	升降温度≤2°C
94°C 30s	45 cycles	
56°C 60s		
98°C 10min	1 cycle	
4°C	forever	

2. 采用 Chip Reader 生物芯片阅读结果

取出微液滴检测通用试剂盒，微液滴检测芯片安装步骤如下按照产品使用说明书操作分析。阈值选择：首先分析实验中阳性对照和阴性对照的 1D 图谱分析，1D 图的 FAM 分布图中，可以看到两个峰，移动阈值线，取两个峰的中间即为阈值线。

3. 计算甲基化率

样本调整划分阈值，甲基化数据收集和分析显示在软件界面中。

甲基化率=甲基化拷贝数 (FAM 拷贝数) / [甲基化拷贝数(FAM 拷贝数)+非甲基化拷贝数(VIC 拷贝数)]×100%

五、质量控制

(1) EC 阴性对照品：甲基化率<4.00%；

(2) EC 阳性对照品：甲基化率≥10.00%。

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【阳性判断值】

使用本产品对 300 例临床样本的 ZNF154 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 值如下：

(1) ZNF154 基因甲基化率≥4.00%，判读结果阳性；

(2) ZNF154 基因甲基化率<4.00%，判读结果阴性。

【检验结果的解释】

1. 检测样本甲基化拷贝数 (FAM 拷贝数) 和非甲基化拷贝数 (VIC 拷贝数) 之和≥100，则该样本检测结果有效，可以继续结果分析；如果小于 100，则该样本检测无效，需要重新检测，若重新检测结果仍无效则判为无效样本，需重新送样检测。

2. 结果判定分为以下几种情况：

ZNF154 基因甲基化率 (%)	判断结果
≥4.00	阳性

<4.00	阴性
-------	----

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不作为食管癌确诊依据，不能代替内镜，不能用于筛查，阴性结果不能完全排除食管癌。
2. 临床诊断为腐蚀性食管狭窄患者不适用本产品。
3. 2.56mg/mL 青霉素对检测结果有影响。
4. 良好的检测结果依赖于样本中肿瘤细胞 DNA 的量，可能在样本收集过程、样本储存方式、病人个体因素（如年龄、其它疾病）以及肿瘤生长方式的等因素的影响，以及不当的实验操作、实验环境污染等原因，均有可能导致假阴性或假阳性结果。

有关假阴性结果的可能原因：

- (1) 不合理的样本采集、转运及处理导致 DNA 降解，或样本中肿瘤细胞 DNA 的量过低；
- (2) 所取样本中无肿瘤细胞成分；
- (3) 亚硫酸氢盐转化实验过程中导致的 Bis-DNA 浓度过低或者失败；
- (4) 未经验证的其它干扰因素或者 PCR 抑制因子。

有关假阳性结果的可能原因：

- (1) 样本采集、运输、核酸提取纯化过程中的样本间污染；
- (2) 实验操作不慎导致阳性对照品或者 PCR 产物污染；
- (3) 其它未经证实的原因导致假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 外观

试剂盒包装完整，无内容物溢出；标签外观完整，无脱落，标签标识内容清晰；试剂盒组成正确，无重复、缺失组分的情况。

2. 阳性符合率

对阳性参考品EC-P1~EC-P12各进行1次检测，结果均为阳性。

3. 阴性符合率

对阴性参考品EC-N1~EC-N5各进行1次检测，结果均为阴性。

4. 最低检测限

(1) 对2种最低检出限参考品EC-S1、ES-S2各进行1次检测，结果均为阳性。

(2) 使用临床阴性样本为基质，稀释不同比例的人食管癌细胞系基因组DNA，进行最低检测限的确定；然后使用临床食管癌患者的食管脱落样本进行最低检测限的验证，结果表明：在核酸浓度为0.625ng/ μ L时，本试剂盒可检出4%甲基化比例的ZNF154基因。

5. 重复性

(1) 对重复性参考品EC-J1重复检测10次，结果均为阴性，且甲基化率为<4.00%，同时VIC(非甲基化)通道拷贝数6000~10000。对重复性参考品EC-J2~EC-J5重复检测10次，结果均为阳性，且EC-J2和EC-J4甲基化率均为4.00%~8.00%、EC-J3和EC-J5甲基化率均为10.00%~20.0

0%，同时每种参考品FAM通道拷贝数log₂对数值的变异系数CV≤10%。

(2) 在全部适用仪器上，分别使用三批试剂盒，采用人食管癌细胞系及临床样本，由两位操作者进行连续20天的检测。结果显示试剂盒的批内、日间、批间、仪器、人员和地点间的检测变异系数均小于等于10%。

6. 交叉反应

本产品检测转化前的食管脱落细胞样本、食管癌其它常见基因甲基化样本、食管黏膜良性病变、胃黏膜良性病变、食管癌前病变样本，其它恶性肿瘤食管脱落细胞样本（口腔癌、喉癌、胃癌、肠癌、胰腺癌、胆囊癌），结果均未出现交叉反应。

7. 干扰研究

干扰研究结果表明，食管脱落细胞样本中含有以下干扰物质：胆红素（0.20mg/mL）、胆固醇（5mg/mL）、血红蛋白（100mg/mL）、甘油三酯（1.5mg/mL），动物DNA（500ng/μL）、植物DNA（500ng/μL）、植物油（10.00μL/mL），常见细菌大肠杆菌（10⁶ cfu/mL）、金黄色葡萄球菌（10⁶ cfu/mL），常用食管或胃疾病药物雷尼替丁（1.2mg/mL）、埃索美拉唑（10.6mg/mL）、吗丁啉（0.14mg/mL）、斯达舒（6.84mg/mL）、红细胞（0.4% v/v）、血清白蛋白（80g/L）、胃酸（0.5% v/v），口腔菌群（包括链球菌、酵母菌、葡萄球菌）（10⁶ CFU/mL），胶囊外皮（200mg）对检测结果无影响。青霉素（2.56mg/m

L) 对检测结果有影响，6%甲基化率的样本加入青霉素后，甲基化率会降低到4%以下，因此建议患者取样前暂停服用该药1天后再采集样本。

8. 临床试验

在4家临床试验机构进行临床试验，共纳入1462例病例。

本产品与临床参考标准的比对研究，共纳入1462例患者，其中食管癌患者656例。结果显示临床灵敏度为91.46%（95%CI：89.08%，93.37%），临床特异度为90.82%（95%CI：88.63%，92.62%）。本产品与临床参考方法（一代测序）的比对研究，共纳入340例样本，其中阳性样本190例，阴性样本150例。结果显示与一代测序的阳性符合率为99.47%（95%CI：97.08%，99.91%），阴性符合率为96%（95%CI：91.55%，98.15%）。采用本产品进行同一患者术前术后样本的研究，45例手术前的试验体外诊断试剂检测为阳性的食管癌患者的术后样本，44例检测为阴性，1例检测为阳性，其中检测为阳性的样本为复发患者。上述结果说明，本产品所检标志物为食管癌特异性标志物。

【注意事项】

1. 本试剂盒含人源细胞系提取的核酸，不具有潜在感染性。
2. 本试剂盒仅用于体外诊断，检测结果仅供临床诊断、治疗与预后参考。
3. 使用者应为专业实验人员，并接受过专业 PCR 实验技能训练，并应参考 PCR 仪器设备使用说明书进行操作。

4. 实验前请仔细阅读本说明书, 熟悉和掌握需使用的各种试剂与仪器的使用方法和注意事项。
5. 不同批号试剂盒组分不可混用、不能使用超过有效期的试剂。
6. 为避免交叉污染, 建议使用带滤芯的移液器吸头。
7. 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, 严格分区。

【参考文献】

1. Wanfeng Z, Peng S, Sen W, et al. *ZNF154* is a promising diagnosis biomarker and predicts biochemical recurrence in prostate cancer[J]. *Gene*, 2018, 675:136-143.
2. Margolin G, Petrykowska H M, Jameel N, et al. Robust Detection of DNA Hypermethylation of *ZNF154* as a Pan-Cancer Locus with in Silico Modeling for Blood-Based Diagnostic Development[J]. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2016, 18(2): 283-298.
3. Wiesmueller F, Kopke J, Aust D, et al. Silenced *ZNF154* Is Associated with Longer Survival in Resectable Pancreatic Cancer[J]. *Int J Mol Sci*. 2019, 20(21), 5437 .

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 安徽达健医学科技有限公司

住所/生产地址：芜湖经济技术开发区东区 9# 厂房（中科芜湖科技园公司内）

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】