

受理号：CSZ1700157

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合
检测试剂盒（可逆末端终止测序法）

产品管理类别：三类 6840

申请人名称：广州燃石医学检验所有限公司

国家食品药品监督管理总局

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	15
四、 风险分析及说明书提示	22
综合评价意见	25

基本信息

一、申请人名称

广州燃石医学检验所有限公司。

二、申请人住所

广州国际生物岛螺旋四路 7 号 3 栋第六层 601 房。

三、生产地址

广州国际生物岛螺旋四路 7 号 3 栋第二层 202 房；广州
国际生物岛螺旋四路 7 号 3 栋第六层 601 房。

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

组分编号	组分名称	管盖颜色	12 人份/盒	36 人份/盒	包装盒编号
A1	阴性质控品 (NC)	白色	4 μ L \times 1 管	4 μ L \times 1 管	试剂盒 1
A2	阳性质控品 (PC)	红色	4 μ L \times 1 管	4 μ L \times 1 管	
	PC 突变类型: EGFR L858R; EGFR T790M; EGFR E746-A750 19del (COSM6225); KRAS G12V; BRAF V600E; EML4 (E6)-ALK (E20)				
A3	DBM 阻断剂 1	蓝色	80 μ L \times 1 管	220 μ L \times 1 管	
A4	Hyb 缓冲液	透明	100 μ L \times 1 管	250 μ L \times 1 管	
A5	RBM 阻断剂 2	橘黄色	8 μ L \times 1 管	20 μ L \times 1 管	
A6	探针 LC001	红色	15 μ L \times 1 管	40 μ L \times 1 管	试剂盒 2
A7	链霉亲和素磁珠	白色	800 μ L \times 1 瓶	2mL \times 1 瓶	试剂盒 3
A8	结合缓冲液	白色	11.5mL \times 1 瓶	31mL \times 1 瓶	试剂盒 4
A9	WB 清洗液 1	白色	4mL \times 1 瓶	9mL \times 1 瓶	
A10	WB 清洗液 2	白色	13mL \times 1 瓶	33mL \times 1 瓶	

试剂盒具体组成成分及配套试剂及软件见说明书。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者经福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织标本中 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异。其中, EGFR 基因中: 19 号外显子缺失 (19del)、L858R 点突变用于吉非替尼片、盐酸埃克替尼片伴随诊断检测, T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测; ALK 基因中: ALK 重排 (融合) 用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测 (具体可参照表 2)。

表 2 伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药物

药物	基因及变异类型
吉非替尼片、 盐酸埃克替尼片	EGFR: 19de1、L858R
甲磺酸奥希替尼片	EGFR: T790M
克唑替尼胶囊	ALK 重排 (融合)

表 3 中为本试剂盒可以检出, 但未经伴随诊断验证的基因突变类型。

表 3 未经伴随诊断验证的基因突变类型

基因名称	突变类型
EGFR	S768I
BRAF	V600E
KRAS	G12V、G12S、G12C、G12R、G12D、 G12A、G13D

其检测结果仅供临床参考, 不应作为患者个体化治疗的唯一依据。临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

(三) 产品包装规格

12 人份/盒; 36 人份/盒。

(四) 产品检验原理

该试剂盒采用 RNA 探针捕获技术, 首先对从 FFPE 样本中提取的组织 DNA 进行片段化、加接头、及 PCR 富集等步骤制备文库; 其后采用具有特定序列的 RNA 探针与文库进行杂交, 从而特异性地捕获来自人类基因组 4 种基因中的部分外显子与内含子区域; 之后通过磁珠法富集被探针捕获的 DNA

片段，并对捕获的文库进行定量与质控；最后将经定量的文库采用基因测序仪（型号：MiSeqDx，Illumina 公司生产）进行高通量测序。采用生物信息学软件判读 4 种靶基因中是否存在来自肿瘤的变异。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

该试剂盒主要原材料包括：探针、链霉亲和素磁珠，阴性质控品（NC）、阳性质控品（PC），这些原材料均为外购方式获得，探针为申请人自行设计后由专业的合成公司合成。申请人选择有资质的供应商提供的原料，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商。制定了各主要原材料质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

企业参考品包括阴性参考品、阳性参考品、重复性参考品和最低检出限参考品。阴性参考品包括 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阴性的正常组织样本、试剂检测范围内 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阴性且其它基因变异阳性（PTEN、PIK3CA、TP53 基因变异阳性）的肺癌组织样本和细胞系样本，阳性参考品、重复性参考品和最低检出限参考品采用临床 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阳性的肺癌组织样本和细胞系样本。

阴性参考品共 13 份，包括 7 份 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阴性的正常肺组织样本或细胞系样本、6 份试剂检测范围内 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阴性且其它基因变异阳性的组织样本或细胞系样本。所有阴性参考品经数字 PCR 和 Sanger 测序法验证。

阳性参考品涵盖了每种突变类型，共 15 份，为临床 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阳性肺癌组织样本或阳性细胞系样本。所有阳性参考品基因变异类型经数字 PCR 和 Sanger 测序法验证。

最低检出限参考品涵盖每种突变类型，共 9 份，由阳性细胞系样本或者经病理诊断为阳性的肺癌组织样本制备，包含 2%的 EGFR/BRAF/KRAS 基因突变比例和 10%ALK 基因重排(融合)突变比例的最低检出限参考品。最低检出限参考品采用数字 PCR 进行基因变异类型确认及突变比例的确定。

重复性参考品涵盖每种突变类型，共 5 份，为临床 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阳性肺癌组织样本或阳性细胞系样本，突变类型突变比例为 10%，重排(融合)类型变异比例为 30%。所有重复性参考品的基因变异类型均经数字 PCR 验证。

本试剂盒设置了阴性质控品 (NC) 和阳性质控品 (PC)，其中，阴性质控品 (NC) 为人正常肺上皮细胞系提取的 DNA 样本，阳性质控品(PC)涵盖每种突变类型，为 EGFR /ALK /BRAF

/KRAS 基因变异阳性细胞系提取的 DNA 样本，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。阴性质控品（NC）和阳性质控品（PC）的基因变异情况均经数字 PCR 验证。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配制，对反应体系中的样本核酸提取试剂、加样量、片段化酶的酶切反应时间、片段化酶用量、纯化磁珠用量、接头连接程序、杂交探针用量、杂交反应时间、乙醇配制比例和放置时间、扩增反应条件等进行筛选和优化，通过企业参考品或临床样本进行功能性试验，最终确定了最佳的反应体系。

（三）分析性能评估

本产品分析性能评估内容包括重复性试验、最低检出限试验、阴/阳性参考品符合率评估、分析特异性研究（干扰因素和交叉反应）、核酸提取试剂等配套试剂盒的组合性能研究、肿瘤组织样本要求研究、不同规格试剂盒的分析性能验证等。

在重复性试验中，申请人采用重复性参考品在 3 批成品试剂盒（201604001、201604002、201604003）上分别完成 10 次重复检测，检测结果一致；同时选取了重复性参考品中未包含，但在试剂盒检测范围内的基因突变或重排（融合）

的临床阳性样本 18 份（来自有资质的临床机构，所有阳性样本的基因变异类型均经数字 PCR 验证）在 3 批成品试剂盒上分别完成 10 次重复检测，检测结果一致；结果表明试剂盒重复性良好。

在最低检出限试验中，申请人选择 9 份带有已知突变（经数字 PCR 验证为 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阳性）的临床阳性样本和 1 份无突变的临床阴性样本（经数字 PCR 验证），根据样本的原始突变比例，按照不同比例稀释成点突变 10%、5%、2%和 1%及重排（融合）30%、20%、10%和 5%的样本，分别使用 3 批试剂盒，每个样本重复检测，依据该梯度研究结果，对于点突变、缺失突变，检测限确认为 2%，重排（融合）的检测限确认为 10%；用 3 批成品试剂盒（201604001、201604002、201604003）进行 9 份最低检出限参考品的检测，每个样本重复检测，结果均能正确检出；同时配制了最低检出限参考品中未包含，但在试剂盒检测范围内的基因突变或重排（融合）的 18 份最低检出限验证样本（临床阳性样本来自有资质的临床机构，其基因变异类型均经数字 PCR 验证）在 3 批成品试剂盒上分别完成重复检测，结果均能正确检出。最终确定该产品能够检测出 50ng DNA 样本中突变比例低至 2%的 EGFR/BRAF/KRAS 基因突变和突变比例低至 10%的 ALK 基因重排（融合）突变。

本试剂盒采用 15 份阳性参考品和 13 份阴性参考品在 3

批成品试剂盒（201604001、201604002、201604003）上分别评价了试剂盒的阳性参考品符合率和阴性参考品符合率，符合率均为 100%。同时选取了阳性参考品中未包含，但在试剂盒检测范围内的基因突变或重排（融合）的临床阳性样本 18 份（来自有资质的临床机构，所有阳性样本的基因变异类型均经数字 PCR 验证）在 3 批成品试剂盒上分别进行检测，结果均能正确检出。干扰因素研究结果显示临床组织样本中可能存在的内源性干扰物（人总蛋白，浓度为 400 ng/ uL），以及外源性干扰物（乙醇、福尔马林、石蜡等，浓度分别为 1% v/v、0.006% v/v 和 1% v/v），均不干扰本试剂盒的检测结果。针对坏死组织对检测结果的影响进行研究，结果显示组织样本中坏死组织占比对样本检测结果无直接影响。

交叉反应研究包括与检测范围内的基因核酸序列相近或具有同源性、易引起交叉反应的野生型或其他突变类型序列的交叉反应，不同基因序列之间的交叉反应以及肺相关感染微生物的交叉反应研究。所用样本包括 PTEN 基因阳性细胞系样本、PIK3CA 基因阳性细胞系样本、TP53 基因阳性细胞系样本、EGFR 同源基因阳性组织样本、KRAS 同源阳性细胞系样本、BRAF 同源基因阳性组织样本、金黄色葡萄球菌/大肠杆菌/白色念珠菌 DNA，经验证，上述样本与该产品均不产生交叉反应。

核酸提取试剂等配套试剂盒的组合性能研究。该产品检

测全过程中需配套各种检测的试剂，申请人对配套试剂组合性能进行了研究，针对可配套使用的 3 种核酸提取试剂、2 种测序试剂，进行交叉实验。经验证，该产品与配套试剂配合使用的检测结果均符合要求，不同组合检测结果均符合要求。

肿瘤组织样本要求的研究中，申请人对不同肿瘤细胞占比对检测结果的影响进行了研究。结果表明，肿瘤细胞占比 10%以上的组织样本可以全部检出。结合临床样本的多样性和复杂性，建议组织样本肿瘤细胞占比 $\geq 20\%$ 。

两种规格试剂盒的分析性能验证。申请人用企业参考品对 12 人份/盒、36 人份/盒两种规格试剂盒进行了阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、重复性、最低检出限的评估，结果符合产品技术要求的規定。

申请人提供了五批产品（12 人份/盒：201603001，36 人份/盒：201603001、201604001、201604002、201604003）在其适用机型上的性能评估资料，结果均符合要求。

（四）阳性判断值

本产品用于阳性判断值确认的组织样本来源于临床医院，样本经数字 PCR 方法验证。

阳性判断值确定：申请人共采用了 54 个样本进行检测，对于 54 个样本分别统计其 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异位点具有双端支持（即正向和反向序列支持）的独特（即去

除 PCR 重复) DNA 片段的情况。通过已知阳性位点具有的数据统计和已知阴性位点的数据统计, 来确定最合适的阴/阳性判断的标准并且使用 Fisher 精确检验, 对使用 2 条具有双端支持(即正向和反向序列支持)的独特(即去除 PCR 重复) DNA 片段区别阴阳的能力进行显著性差异检验。将上述样本阴/阳性判断结果对应的具有双端支持(即正向和反向序列支持)的独特(即去除 PCR 重复) DNA 片段的数量进行统计分析计算, 结果显示, 当检出突变的双端支持(即正向和反向序列支持)的独特(即去除 PCR 重复) DNA 片段 ≥ 2 时, 能够 100% 正确区分阳性和阴性结果并且具有非常显著的统计学差异, 表明当检出突变的双端支持(即正向和反向序列支持)的独特(即去除 PCR 重复) DNA 片段 ≥ 2 时, 能够正确区分阳性和阴性结果。

阳性判断值验证: 用临床组织样本或者细胞系样本构建 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异阳性(具有临床用药指导意义的位点, 包括 SNV、INDEL 和 fusion) 或阴性的参考品进行检测, 共获得 107 个样本原始数据, 分别测试阳性符合率、阴性符合率、重复性, 最低检出限。结果表明, 阳性符合率、阴性符合率、重复性、最低检出限都 100% 吻合, 总体验证结果符合要求。

综合以上研究确认, 本产品的阳性判断标准为: 经过燃石数据分析流程(数据分析流程见说明书)处理后, 符合质

量指标要求的突变结果进行阴/阳性判断。如突变的双端支持（即正向和反向序列支持）的独特（即去除 PCR 重复）DNA 片段 ≥ 2 时，判断为阳性；反之，则判断为阴性。

（五）稳定性

申请人对该产品实时稳定性、运输稳定性、冻融稳定性、开瓶稳定性进行了研究，确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。同时对石蜡样本稳定性、核酸（DNA）溶液稳定性、文库稳定性等进行了研究，确定了检测过程中各种样本类型的有效保存时间。

实时稳定性研究：采用三批次试剂盒（批号：00020141102、00020141103、00020141201）储存于试剂盒标示储存条件下分别在 0、3 月、6 月、9 月、12 月和 15 月对物理性能、准确度等进行考察，各项性能指标均符合要求，确定产品标示保存条件为：试剂盒 1（ $-25^{\circ}\text{C} \sim 15^{\circ}\text{C}$ ）、试剂盒 2（ $-85^{\circ}\text{C} \sim 70^{\circ}\text{C}$ ）、试剂盒 3（ $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ ）、试剂盒 4（常温： $10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ ），可稳定保存 12 个月。

运输稳定性研究：申请人对试剂的运输稳定性进行研究，采用三批试剂盒（批号：00020141102、00020141103、00020141201）分别在模拟极限运输温度条件下放置 7 天后进行实时稳定性考察，各项性能指标均符合要求；另外选取适量试剂盒在规定运输方式下运输 5 天后，对物理性能、准确度等进行考察，各项性能指标均符合要求。确定了该产品的

运输条件。

冻融稳定性研究：将三批次成品试剂盒（批号：00020150901、00020150902、00020150903）反复冻融数次，分别在反复冻融第 0, 1, 3, 5, 7, 8, 9 次后对物理性能、准确度等进行考察，结果均无影响。为保证检测结果的稳定性，推荐使用过程中试剂尽量避免反复冻融，并且冻融次数最多不超过 6 次。

开瓶稳定性研究：将三批次成品试剂盒（批号：201604001、201604002、201604003）在储存前进行开瓶；同时设立正常温度储存未开瓶的（0 个月）的试剂盒，作为本次研究的对照组；将实验组的 3 批试剂分别模拟使用，开瓶 2 小时，然后按照储存条件放置，分别在相应的节点时间进行检测，检测项目包括：外观、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、重复性、最低检出限检验。结果显示，开瓶后的试剂盒在试剂盒标示储存条件下保存 12 个月，各项性能指标均满足要求。

申请人对石蜡样本稳定性、核酸（DNA）溶液稳定性、文库稳定性等进行了研究。研究确认石蜡组织样本保存年限应不超过 2 年；核酸（DNA）溶液-20℃或-80℃可以保存 5 年；为保证检测结果的稳定性，建议提取的 DNA 保存时间不超过 6 个月，同时尽量避免文库的反复冻融，次数不得超过 4 次。

三、临床评价摘要

(一) 比较研究

申请人在四川大学华西医院、上海市胸科医院、中国医学科学院肿瘤医院、复旦大学附属肿瘤医院、上海市肺科医院共 5 家临床试验机构完成了临床试验。采用考核试剂与已上市产品对临床样本进行比较研究的方法，验证本产品的临床性能。入组样本为非小细胞肺癌样本 1334 例（主要是腺癌和少部分鳞癌、腺鳞癌等）和干扰样本 126 例（主要包括良性肿瘤和小细胞癌），样本类型为石蜡包埋组织，共计 1460 例。对比方法选择已上市产品：ALK 基因重组检测试剂盒（荧光原位杂交法）（注册证号：国械注进 20143405183）、人类 EGFR 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）（注册证号：国食药监械（准）字 2014 第 3400973 号）、人 BRAF 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）（注册证号：国食药监械（准）字 2014 第 3401045 号）、人 KRAS 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）（注册证号：国食药监械（准）字 2013 第 3400175 号）以及 Sanger 测序方法。考核试剂与对比方法检测结果不一致的样本或对比方法不能具体分型的样本，采用 Sanger 测序方法进行序列测定。

本临床试验共检测出 963 例突变阳性样本，阳性率为 66.0%，包括 EGFR 基因中 343 例 L858R 突变阳性、43 例 T790M 突变阳性、336 例 Exon19 Deletion 突变阳性、8 例 S768I 突

变阳性；KRAS 基因中 47 例 G12V 突变阳性、6 例 G12S 突变阳性、30 例 G12C 突变阳性、1 例 G12R 突变阳性、20 例 G12D 突变阳性、5 例 G12A 突变阳性、7 例 G13D 突变阳性；ALK 基因中 139 例 ALK 基因重排（融合）阳性；BRAF 基因中 26 例 V600E 突变阳性。

与对比方法的研究结果显示，考核试剂的定性检测结果阳性符合率为 98.6%（95%CI 97.7%-99.3%），阴性符合率为 94.0%（95%CI 91.6%-95.9%），总符合率为 97.0%（95%CI 96.0%-97.8%），采用卡方检验进行统计学分析，卡方检验： $p\text{-value}=1$ ，两组检测结果无差异，显示二者具有较好的检测一致性。

在 1460 例样本中，两种方法检测结果不一致的样本共 45 例，15 例样本 sanger 测序方法的检测结果与考核试剂检测结果一致，15 例样本考核试剂 NGS 检出突变位点不在对比方法检测范围内，15 例样本疑为不同方法检测差异引起的不一致。

（二）伴随诊断比较研究

1. EGFR 基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

在上海市胸科医院、中国医学科学院肿瘤医院共 2 家临床机构入组样本中选择部分样本进行与已上市的伴随诊断试剂“cobas® EGFR Mutation Test v2”的对比研究。本次对比研究共检测 232 例福尔马林固定的石蜡包埋的非小细胞肺

癌组织样本，NGS 检测突变阳性 137 例（L858R 突变阳性 66 例、T790M 突变阳性 38 例、19del 突变阳性 67 例、S768I 突变阳性 1 例）、突变阴性 95 例。与 cobas 检测结果相比，有 4 例不一致样本。经统计分析，EGFR 基因 NGS 检测结果为：L858R 突变定性检测结果阳性符合率为 100.0%（95%CI 94.5%-100.0%），阴性符合率为 99.4%（95%CI 96.7%-100.0%），总符合率为 99.6%（95%CI 97.6%-100.0%）；T790M 突变定性检测结果阳性符合率为 100.0%（95%CI 90.3%-100.0%），阴性符合率为 99.0%（95%CI 96.4%-99.9%），总符合率为 99.1%（95%CI 96.9%-99.9%）；19del 突变定性检测结果阳性符合率为 98.5%（95%CI 92.1%-100.0%），阴性符合率为 100.0%（95%CI 97.8%-100.0%），总符合率为 99.6%（95%CI 97.6%-100.0%）；S768I 突变定性检测结果阳性符合率为 100.0%（95%CI 2.5%-100.0%），阴性符合率为 100.0%（95%CI 98.4%-100.0%），总符合率为 100.0%（95%CI 98.4%-100.0%）；结果显示 NGS 检测 EGFR 基因定性检测结果阳性符合率为 99.3%（95%CI 95.9%-100.0%），阴性符合率为 96.9%（95%CI 91.2%-99.4%），总符合率为 98.3%（95%CI 95.6%-99.5%），采用卡方检验进行统计学分析，卡方检验： $p\text{-value}=1$ ，两组检测结果无差异，显示二者具有较好的检测一致性。不一致样本为 NGS 检出阳性，cobas 检出阴性，其测序丰度均较低。

2. ALK 基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

对四川大学华西医院、上海市胸科医院、中国医学科学院肿瘤医院、复旦大学附属肿瘤医院、上海市肺科医院共 5 家临床机构的入组样本均进行与已上市批准的伴随诊断试剂“ALK 基因重组检测试剂盒(荧光原位杂交法)”的对比研究。本次对比研究共检测 1460 例样本，与其相比，结果显示 NGS 检测 ALK 基因重排(融合)定性检测结果阳性符合率为 95.7% (95%CI 91.0%-98.4%)，阴性符合率为 99.7% (95%CI 99.2%-99.9%)，总符合率为 99.3% (95%CI 98.7%-99.7%)，采用卡方检验进行统计学分析，卡方检验：p-value=1，两组检测结果无差异，显示二者具有较好的检测一致性。2 例不一致样本经 sanger 测序方法确认，全部与 NGS 结果一致。

(三) TKI 药物疗效相关的回顾性临床研究

基于上述两项临床研究结果，为进一步验证该产品伴随诊断性能，申请人在四川大学华西医院、上海市胸科医院、中国医学科学院肿瘤医院、复旦大学附属肿瘤医院、上海市肺科医院共 5 家临床试验机构进行了 EGFR-TKI、ALK-TKI 治疗的回顾性疗效分析研究，共入组有效病例 86 例。

1. 吉非替尼片(易瑞沙)药效相关研究

申请人对部分经考核试剂检测为 EGFR 敏感突变阳性样本的患者进行了吉非替尼片(易瑞沙)治疗的回顾性疗效分析，纳入 29 例晚期非小细胞肺癌有效病例的石蜡包埋组织样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示为 EGFR 敏感突变阳

性（21号外显子 L858R 突变阳性或 19号外显子缺失突变阳性），随后服用吉非替尼片（易瑞沙）治疗，22例临床评估部分缓解，7例评估疾病稳定，临床用药客观缓解率为 75.9%（95%CI 56.5%-89.7%）、疾病控制率为 100%（95%CI 88.1%-100.0%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者用药前样本经考核试剂检测，结果均显示为 EGFR 敏感突变阳性（L858R 突变阳性或 19号外显子缺失突变阳性），与临床既往分子检测结果一致。

2. 盐酸埃克替尼片（凯美纳）药效相关研究

申请人对部分经考核试剂检测为 EGFR 敏感突变阳性样本的患者进行了盐酸埃克替尼片（凯美纳）治疗的回顾性疗效分析，纳入 21例晚期非小细胞肺癌有效病例的石蜡包埋组织样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示为 EGFR 敏感突变阳性（21号外显子 L858R 突变阳性或 19号外显子缺失突变阳性），随后服用盐酸埃克替尼片（凯美纳）治疗，18例临床评估部分缓解，3例评估疾病稳定，临床用药客观缓解率为 85.7%（95%CI 63.7%-97.0%）、疾病控制率为 100%（95%CI 83.9%-100.0%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者用药前样本经考核试剂检测结果均显示为 EGFR 敏感突变阳性（L858R 突变阳性或 19号外显子缺失突变阳性），与临床既往分子检测结果一致。

3. 克唑替尼胶囊（赛可瑞）药效相关研究

申请人对部分经考核试剂检测为 ALK 重排（融合）阳性样本的患者进行了克唑替尼胶囊（赛可瑞）治疗的回顾性疗效分析，纳入 13 例晚期非小细胞肺癌有效病例的石蜡包埋组织样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示 13 例均为 ALK 基因重排（融合）阳性，随后服用克唑替尼胶囊（赛可瑞）治疗，10 例临床评估部分缓解，2 例评估疾病稳定，1 例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为 76.9%（95%CI 46.2%-95.0%）、疾病控制率为 92.3%（95%CI 64.0%-99.8%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者用药前样本经考核试剂检测结果均显示为 ALK 基因重排（融合）阳性，与临床既往分子检测结果一致。

4. 甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）药效相关研究

申请人对部分经考核试剂检测为 EGFR T790M 突变阳性样本的患者进行了甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）治疗的回顾性疗效分析，纳入 13 例晚期非小细胞肺癌有效病例的石蜡包埋组织样本。9 例受试者用药前样本靶点检测结果显示为 EGFR 基因 T790M 突变阳性、余 4 例不详，随后均按照 AZD9291 的临床试验要求服用甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）后，11 例临床评估部分缓解，2 例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为 84.6%（95%CI 54.6%-98.1%）、疾病控制率为 100%（95%CI 75.3%-100.0%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者用药前样本经考核试剂检测结果均显示为

EGFR T790M 突变阳性（部分合并 L858R 突变阳性或 19 号外显子缺失突变阳性），与临床既往分子检测结果一致。

5. 盐酸厄洛替尼片（特罗凯）药效相关研究

申请人对部分经考核试剂检测为 EGFR 敏感突变阳性样本的患者进行了厄洛替尼片（特罗凯）治疗的回顾性疗效分析，纳入 8 例晚期非小细胞肺癌有效病例的石蜡包埋组织样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示为 EGFR 敏感突变阳性（21 号外显子 L858R 突变阳性或 19 号外显子缺失突变阳性），随后服用盐酸厄洛替尼片（特罗凯）治疗，6 例临床评估部分缓解，2 例评估疾病稳定，临床用药客观缓解率为 75.0%（95%CI 34.9%-96.8%）、疾病控制率为 100%（95%CI 63.1%-100.0%）。且受试者用药前样本经考核试剂检测结果均显示为 EGFR 敏感突变阳性（L858R 突变阳性或 19 号外显子缺失突变阳性），与临床既往分子检测结果一致。但因该部分有效样本量未能达到预期统计学要求，未能进行具有统计学意义的临床研究分析，故本次临床研究中未明确盐酸厄洛替尼片（特罗凯）与本产品伴随关系。

6. 其他

申请人进行的 TKI 治疗的回顾性疗效分析中，另有 2 例受试者因未能提供服用 TKI 靶向药物的名称，未纳入统计。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面研究，临床试验符合要求。

四、风险分析及说明书提示

参照“YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对该产品进行风险分析。经综合评价，人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）的受益和风险总结如下：

本试剂盒检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到样本 DNA 提取质量、实验操作、实验环境等限制，导致可能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可能存在的潜在风险及检测的局限性。

本试剂盒用于非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织样本中 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异的定性检测。不合理的样本采集、转运、处理以及用不满足说明书中【样本要求】的 FFPE 组织样本提取得到的 DNA 进行检测，会导致假阳性或假阴性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作。同时由于肿瘤组织可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。

本试剂盒阴性的检测结果不能完全排除靶基因突变的存在，样本中肿瘤细胞过少、过度降解、突变类型不在试剂盒检测范围内或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成假阴性结果。

本试剂盒在检测过程中涉及基因扩增，在非可控的实验室操作可能由于环境中气溶胶的存在导致结果不可靠，同时PCR操作过程中气溶胶的泄露可能会导致设备甚至实验室的污染。因此，请在可控的实验室进行检测操作，操作人员需根据《医疗机构临床基因扩增管理办法》进行专业培训，非专业的操作及操作不当会影响检测质量。

本试剂盒为基于二代测序平台的多基因位点的伴随诊断产品，检测过程主要包括FFPE样本中DNA提取、文库制备、杂交捕获、测序及数据分析等步骤。为确保检测全流程的质量得到有效控制，在产品的设计开发阶段对样本提取试剂、文库质控试剂及测序试剂进行了全流程匹配性验证，为了确保检测结果的准确性，配套开发了测序数据分析及结果判读的生物信息分析软件。请使用本试剂盒推荐使用的配套试剂盒及软件进行检测，本试剂盒未对其他配套试剂盒及软件进行对比验证。

通过环境控制、生产监控、成品检验和增加说明书警示内容等防范措施，对该产品的已知和可预见的安全风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在验收准则规定的可接受范围内，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获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以

下信息：

1. 适用范围：用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织标本中 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 基因变异。其中，EGFR 基因中：19 号外显子缺失（19del）、L858R 点突变用于吉非替尼、埃克替尼的伴随诊断检测，T790M 点突变用于奥希替尼的伴随诊断检测；ALK 基因中：ALK 重排（融合）用于克唑替尼的伴随诊断检测，其它稀有突变本产品检测试剂可以检出，但 EGFR /ALK /BRAF /KRAS 相关肿瘤药物安全性和有效性尚未确定。

2. 警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品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，属于创新审批项目（编号：201600077）。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。申请人在该产品上市后应继续对产品伴随诊断用途进行验证。请在至少两家临床机构随访收集伴随诊断4种药物（吉非替尼、埃克替尼、克唑替尼、奥希替尼）的临床用药疗效随访数据，作为临床补充资料在产品下一次延续注册时提交。临床用药疗效随访数据应包括：病理诊断信息，应用本产品检测信息，患者用药疗效终点至最佳疗效的疗效数据，每种药物相关数据应满足统计学意义。该项临床资料应由出具数据的各临床试验机构签章。

2018年7月10日

附件：产品说明书

人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）说明书

【产品名称】

人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合检测试剂盒
(可逆末端终止测序法)

【包装规格】

12 人份/盒；36 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织标本中 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因变异。其中，EGFR 基因中：19 号外显子缺失（19del）、L858R 点突变用于吉非替尼片、盐酸埃克替尼片伴随诊断检测；T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测；ALK 基因中：ALK 重排（融合）用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测（具体可参照表 1）。

表 1 伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药物

药物	基因及变异类型
吉非替尼片、盐酸埃克替尼片	EGFR: 19del、L858R
甲磺酸奥希替尼片	EGFR: T790M
克唑替尼胶囊	ALK 重排（融合）

表 2 中为本试剂盒可以检出，但未经伴随诊断验证的基因突变类型。

表 2 未经伴随诊断验证的基因突变类型

基因名称	突变类型
EGFR	S768I
BRAF	V600E
KRAS	G12V、G12S、G12C、G12R、G12D、G12A、G13D

其检测结果仅供临床参考，不应作为患者个体化治疗的唯一依据。临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

肺癌是数十年内世界范围内最常见的癌症。世界卫生组织（WHO）将肺癌分为 2 个主要类别：非小细胞肺癌（NSCLC）和小细胞肺癌（SCLC）。NSCLC 占全部肺癌病例的 80% 以上^[1]。

近年来，针对 NSCLC 的靶向治疗进展迅速，已获批准的药物包括：EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（TKI）如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼等；克唑替尼及其他 ALK 抑制剂；BRAF 抑制剂、MEK 抑制剂等。这些靶向治疗药物均仅针对携带特定基因变异的 NSCLC 人群有效。因此，随着靶向治疗药物的发展，与之配合的分子伴随诊断变得必不可少^[1,2]。

EGFR 的热点敏感突变包括 19 号外显子缺失突变（19del）及 21 号外显子 L858R 点突变^[3]，其他如 20 号外显子 S768I 点突变亦为已知敏感突变^[1,2,3]。并非所有 EGFR 突变均对所有 EGFR-TKI 敏感，如 20 号外显子 T790M 点突变为第一代 EGFR-TKI 的耐药突变，但对第三代 EGFR-TKI 奥希替尼敏感^[1,2,4]。

ALK 基因重排（融合）是 NSCLC 中发现的第二个明确可靶向用药的驱动基因变异，发生率约为 2-7%，常见于年轻、不吸烟的肺腺癌患者。针对性靶向药物包括克唑替尼及其他新一代 ALK 抑制剂^[1,2,5]。

BRAF V600E 突变是 NSCLC 中较罕见、但已被确认的可靶向用药的驱动基因变异，在 NSCLC 中发生率约为 1-2%^[6]。针对性靶向治疗包括 BRAF 抑制剂与 MEK 抑制剂的联合治疗^[1,7,8]。

KRAS 突变常见于非亚裔、吸烟、肺粘液性腺癌患者^[9]。携带 KRAS 突变的 NSCLC 患者可能对 EGFR-TKI 原发性耐药^[10]，且为 NSCLC 不良预后因子之一^[11]。由于驱动基因突变往往存在互斥性，KRAS 突变检测可帮助鉴别无法从进一步分子检测获益的 NSCLC 患者^[1]。

【检测原理】

本试剂盒采用 RNA 探针捕获技术，首先对从 FFPE 样本中提取的组织 DNA 进行片段化、加接头及 PCR 富集等步骤制备预文库；其后采用具有特定序列的 RNA 探针与预文库进行杂交，从而特异性地捕获来自人类基因组 4 种基因中的部分外显子与内含子区域；之后通过磁珠法富集被探针捕获的 DNA 片段，并对捕获的文库进行定量与质控；最后将经定量的文库采用基因测序仪进行高通量测序。采用生物信息学软件通过对测序数据拼接并与人类基因组序列进行比对，判读 4 种靶基因中是否存在来自肿瘤的不同的变异。

下图为本试剂盒的检测步骤简图。本试剂盒包含阴、阳性质控品，用来监控实验环节及数据分析环节的随机误差及系统误差。

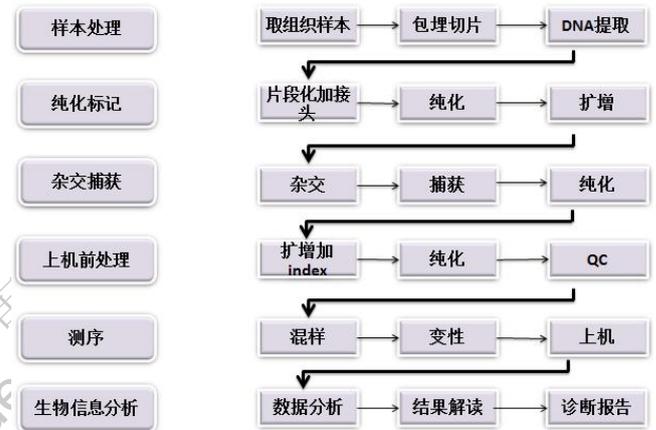


图 1 试剂盒检测步骤示意图

【主要组成成份】

组分编号	组分名称	管盖颜色	12 人份/盒	36 人份/盒	包装盒编号	
A1	阴性质控品 (NC)	白色	4μL×1 管	4μL×1 管	试剂盒 1	
	阳性质控品 (PC)	红色	4μL×1 管	4μL×1 管		
A2	PC 突变类型： EGFR L858R；EGFR T790M；EGFR E746-A750 19del (COSM6225)； KRAS G12V；BRAF V600E；EML4 (E6)-ALK (E20)					
	A3	DBM 阻断剂 1	蓝色	80μL×1 管		220μL×1 管
A4	Hyb 缓冲液	透明	100μL×1 管	250μL×1 管		
A5	RBM 阻断剂 2	橘黄色	8μL×1 管	20μL×1 管		
A6	探针 LC001	红色	15μL×1 管	40μL×1 管		试剂盒 2
A7	链霉亲和素磁珠	白色	800μL×1 瓶	2mL×1 瓶		试剂盒 3
A8	结合缓冲液	白色	11.5mL×1 瓶	31mL×1 瓶		试剂盒 4
A9	WB 清洗液 1	白色	4mL×1 瓶	9mL×1 瓶		
A10	WB 清洗液 2	白色	13mL×1 瓶	33mL×1 瓶		

注：同一组分不同批号不能混用。

组分编号	组分名称	主要组成成分
A1	阴性质控品 (NC)	阴性基因组 DNA, 三羟甲基氨基甲烷, 乙二胺四乙酸, 无核酸酶水
A2	阳性质控品 (PC) PC 突变类型: EGFR L858R; EGFR T790M; EGFR E746-A750-19del(COSM6225); KRAS G12V; BRAF V600E; EML4 (E6)-ALK (E20)	含特定突变的基因组 DNA, 三羟甲基氨基甲烷, 乙二胺四乙酸, 无核酸酶水
A3	DBM 阻断剂 1	寡核苷酸, 三羟甲基氨基甲烷, 乙二胺四乙酸, 无核酸酶水
A4	Hyb 缓冲液	氯化钠, 磷酸二氢钠, 乙二胺四乙酸, 十二烷基硫酸钠, 无核酸酶水
A5	RBM 阻断剂 2	寡核苷酸, 三羟甲基氨基甲烷, 乙二胺四乙酸, 无核酸酶水
A6	探针 LC001	寡核苷酸探针, 三羟甲基氨基甲烷, 乙二胺四乙酸, 无核酸酶水
A7	链霉亲和素磁珠	共价结合链霉亲和素的超顺磁微粒悬液
A8	结合缓冲液	氯化钠, 三羟甲基氨基甲烷, 无核酸酶水
A9	WB 清洗液 1	氯化钠, 柠檬酸钠, 十二烷基硫酸钠, 无核酸酶水
A10	WB 清洗液 2	氯化钠, 柠檬酸钠, 十二烷基硫酸钠, 无核酸酶水

注：同一组分不同批号不能混用。

本试剂盒不包含，但推荐配套使用的试剂和软件如下：

用途	试剂盒名称	分类	注册/备案证号
核酸提取	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (QIAGEN 公司生产)	一类	国械备 20180418 号
	MagPure FFPE DNA LQ Kit (广州美基生物科技有限公司生产)	一类	
	核酸提取或纯化试剂 (广州燃石医学检验所有限公司生产)	一类	粤穗械备 20170022 号
纯化标记	测序反应通用试剂盒 (广州燃石医学检验所有限公司生产)	一类	粤穗械备 20160165 号
文库 QC	Qubit® dsDNA HS Assay Kit (Life 公司生产)		
	Agilent High Sensitivity DNA Kit (安捷伦公司生产)		
	AgilentDNA 1000 Kit (安捷伦公司生产)		
测序	MiSeq Reagent Kit v2 (Illumina 公司生产)	一类	
	MiSeq Reagent Micro Kit v2 (Illumina 公司生产)	一类	
	MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina 公司生产)	一类	
	MiSeqDx Reagent Kit v3 (Illumina 公司生产)	一类	国械备 20180410 号
	基因测序用测序试剂盒 (广州燃石医学检验所有限公司生产)	一类	粤穗械备 20170088 号
数据分析	肿瘤个体化二代测序数据分析系统 (广州燃石医学检验所有限公司生产)	二类	

注：推荐配套使用的试剂及软件应明确医疗器械分类，获得上市许可

或经备案后使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒的储存温度如下表：

组分编号	组分名称	储存温度	包装盒编号
A1	阴性质控品 (NC)	-25 ~ -15℃	试剂盒 1
A2	阳性质控品 (PC)		
A3	DBM 阻断剂 1		
A4	Hyb 缓冲液		
A5	RBM 阻断剂 2	-85 ~ -70℃	试剂盒 2
A6	探针 LC001		
A7	链霉亲和素磁珠	2 ~ 8℃	试剂盒 3
A8	结合缓冲液		
A9	WB 清洗液 1		
A10	WB 清洗液 2		
		10 ~ 30℃	试剂盒 4

试剂盒有效期：12个月。

试剂盒 1 和试剂盒 2 应避免反复冻融，冻融次数应小于 6 次。

开瓶稳定性：试剂盒开瓶后，在试剂盒有效期内稳定。

运输条件：试剂盒在以下运输方式和运输条件下运输，不超过 5 天。

序号	试剂盒	运输方式	运输条件	运输时间
1	试剂盒 1	干冰运输	不超过 -20℃	不超过 5 天
2	试剂盒 2			
3	试剂盒 3	冰袋运输	不超过 37℃	不超过 5 天
4	试剂盒 4	常规运输	不超过 37℃	不超过 5 天

生产日期及有效期至：见标签。

【适用仪器】

基因测序仪（型号：MiSeqDx），Illumina 公司生产。

【样本要求】

福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 的非小细胞肺癌 (NSCLC) 组织样本中提取的人类基因组 DNA。保存年限不超过 2 年的石蜡组织样本均可用于本试剂盒检测。样本必须按照标准的病理学方法进行处理和保存，以确保样本的质量。组织标本中肿瘤细胞含量应达 20% 以上。

【检验方法】

1. 样本提取阶段

1.1 切片样本准备

- 向 1.5 mL 离心管中加入 180 μL 裂解液 ATL。
- 收集切片上的组织：刮片后将刀片上组织尽可能送至 1.5 mL 离心管的裂解液 ATL 溶液中。
- 加入 300 μL 脱蜡剂，涡旋混匀，短暂离心收集管壁上液滴。置于 56℃，加热 3 min。
- 短暂离心，加入 20 μL 蛋白酶 K，涡旋混匀，短暂离心。

1.2 蜡卷样本准备

- 样本管短暂离心 30 s 左右，收集样本在管底部。
- 加入 300 μL 脱蜡剂，涡旋混匀，短暂离心收集管壁上液滴。置于 56℃，加热 3 min。（注：如果脱蜡不完全，可重复 b 步骤一次。）
- 短暂离心，加入 150 μL 裂解液 ATL 和 20 μL 蛋白酶 K，涡旋混匀，短暂离心。

1.3 核酸提取

- 将上面处理好的样本放置于恒温混匀仪上，56℃，1100 rpm 加热 2 h 或过夜消化。
- 将上一步的样本放置于恒温混匀仪上，90℃，1100 rpm 孵育 1 h。（注：恒温混匀仪需等温度升到 90℃ 再放入样本。）

- c. 取出样本后，短暂离心，立即吸取下层消化液至新的 1.5 mL 离心管中。（注：尽量不吸取上层蜡液；如果这个过程蜡层出现凝固，可再放置到恒温混匀仪中至蜡融化。）
- d. 13400 rpm 离心 1 min，可见少量组织沉淀，吸取上清。（注：此时上层可能有残余蜡层，吸取上清时注意避免吸到蜡层，切勿吸到沉淀。）
- e. 向样本管中加入 20 μ L 的 10 mg/mL RNaseA，轻柔涡旋混匀，短暂离心，室温静置 5 min，将洗脱液 EB 提前于 37 $^{\circ}$ C 预热。
- f. 加 150 μ L 变性液 AL 至样本管中，涡旋混匀，短暂离心。
- g. 向样本管中加入 20 μ L 磁珠 MP 与 350 μ L 结合液 BD，将样本管放置于旋转混匀仪上旋转孵育 5 min。
- h. 短暂离心后，将样本管转移至磁力架上吸附 1-3 min，待溶液澄清，吸弃废液。
- i. 加入 500 μ L 洗涤液 BW1，涡旋重悬磁珠。短暂离心后将样本管转移至磁力架上吸附 1-3 min，待溶液澄清，吸弃废液。
- j. 加入 500 μ L 洗涤液 BW2，涡旋重悬磁珠，短暂离心后将样本管转移至磁力架上吸附 1-3 min，待溶液澄清，吸弃废液。
- k. 重复步骤 j 一次。
- l. 短暂离心后，样本管转移至磁力架吸附 1-3 min，待溶液澄清，尽量吸弃所有废液。
- m. 打开管盖，37 $^{\circ}$ C 干燥 1-3 min，期间观察磁珠暗沉无反光即可。（注：不要过分干燥，以免磁珠出现裂痕影响提取效果。）
- n. 加入 55 μ L 洗脱液 EB，涡旋重悬磁珠，56 $^{\circ}$ C 孵育 5 min。短暂离心后转移至磁力架上吸附 1-3 min，待溶液澄清，将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中。（注：如果 DNA 浓度过高，出现磁珠成团现象，洗脱液 EB 可加倍。）
- o. 13400 rpm 离心 2 min，样本管转移至磁力架上吸附 1-3 min，将上清转移至新的 1.5 mL 离心管中。

1.4 提取后的 DNA 使用 Nanodrop 检测纯度， OD_{260}/OD_{280} 应在 1.7-2.1 内；使用 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 试剂盒检测浓度，提取总量应 ≥ 50 ng。

1.5 上述操作是根据核酸提取或纯化试剂（广州燃石医学检验有限公司生产）说明书进行样本提取，如使用其它推荐配套使用的核酸提取试剂，需参考相应试剂盒的说明书操作。

注：提取后的 DNA 溶液，如不立即进行实验，应置于 -20 $^{\circ}$ C 保存，保存时间不长于 6 个月。

2. 纯化标记阶段：

2.1 样本准备

取试剂盒的阴性质控品（NC）和阳性质控品（PC）各 2 μ L 伴随待测样本同步检测，待测样本按照如下步骤进行操作：

- 若 DNA 浓度等于 25 ng/ μ L，取其中 2 μ L 样本进行实验；
- 若 DNA 浓度大于 25 ng/ μ L，将样本用无核酸酶水稀释至 25 ng/ μ L 后，再取其中的 2 μ L 进行实验；
- 若 DNA 浓度小于 25 ng/ μ L，将样本放置浓缩仪上进行浓缩并使用 Qubit dsDNA HS Assay Kit 试剂盒测定浓度；如仍小于 25 ng/ μ L，则需要继续浓缩并重复测定浓度直至浓缩到 25 ng/ μ L 以上，按 2.1 步骤 a 或 b 进行实验。推荐使用 Eppendorf 公司的 Concentrator plus 真空浓缩仪（转速 1400rpm，真空度 <20mbar），浓缩温度 45 $^{\circ}$ C，时间不超过 2 h。

2.2 DNA 片段化及加接头

- 首次使用测序反应通用试剂盒中片段化终止液时，需稀释片段化终止液至工作液：片段化终止液和无水乙醇稀释比例为 3:1，例如 450 μ L 的片段化终止液加 150 μ L 无水乙醇，混匀并做好标记备用。
- 向待测样本管中依次加入 17 μ L 混匀的片段化缓冲液和 1.5 μ L 片段化反应液至管底，吹打混匀，短暂离心后放置冰上备用。

（注：冰上配制以上反应体系，每种试剂单独加入，勿配混合 Mix。）

- 设置 PCR 仪的反应程序（45 $^{\circ}$ C 10 min；4 $^{\circ}$ C 1 min；4 $^{\circ}$ C Hold；热盖 105 $^{\circ}$ C），温度达 45 $^{\circ}$ C 时，放入样本管进行反应，时间不能超过 10 min。程序结束后，立即将其转移至冰上。
 - 加 32 μ L 稀释好的片段化终止液，涡旋混匀，短暂离心，室温孵育 1 min，进行下一步纯化。
- ### 2.3 磁珠纯化
- 充分混匀已平衡至室温的纯化磁珠，取 52 μ L 至新的 1.5 mL 离心管中。
 - 加入上述片段化及加接头的样本，混匀，置于低转速旋转混匀仪上室温孵育 5 min（若无旋转混匀仪，可每分钟上下颠倒几次，保证磁珠不沉底即可）。
 - 配制 75%乙醇备用。
 - 孵育结束，短暂离心后将样本管放置磁力架上吸附磁珠（约 3-5 min），待溶液澄清后，弃上清。
 - 保持离心管在磁力架上，加入 300 μ L 75%乙醇，计时 1 min（注：为使清洗充分，可将样本管在磁力架上旋转一圈），弃上清。
 - 重复步骤 e 一次，共两次。
 - 将离心管短暂离心，重新放回磁力架静置 30 s，吸净管内残留液体。
 - 37 $^{\circ}$ C 干燥磁珠，时间约为 1-3 min（确保磁珠不干燥，否则会影响溶解效率）。
 - 加 36 μ L 已恢复至室温的无核酸酶水，涡旋混匀，短暂离心。
 - 室温孵育 2 min，放置磁力架上，待溶液澄清后，取上清（约 35 μ L）至新的 PCR 管中，放置冰上备用。

2.4 预文库扩增

- 按照下表冰上配制 PCR 反应体系 1。

表3 PCR反应体系1

试剂名称	1 个反应 (μ L)
扩增缓冲液	10
dNTP 混合液	0.5
二甲亚砜	2.5
引物 A1	1
扩增反应液	1
合计	15

- 取 15 μ L PCR 反应体系加入到上一步纯化的样本中，混匀，短暂离心。
 - 放置于 PCR 仪上进行反应【反应程序：68 $^{\circ}$ C 2 min；98 $^{\circ}$ C 2 min；（98 $^{\circ}$ C 30 s，57 $^{\circ}$ C 30 s，72 $^{\circ}$ C 1 min）10cycles；72 $^{\circ}$ C 5 min；4 $^{\circ}$ C hold；热盖 105 $^{\circ}$ C】。
 - 反应结束后放置冰上备用。
- ### 2.5 磁珠纯化
- 充分混匀已平衡至室温的纯化磁珠，取 50 μ L 至新的 1.5 mL 离心管中。
 - 加入 PCR 反应产物，混匀，置于低转速旋转混匀仪上室温孵育 5 min（若无旋转混匀仪，可每分钟上下颠倒几次，保证磁珠不沉底即可）。
 - 同上述步骤 2.3 的 c-h 操作。
 - 加 15 μ L 已恢复至室温的无核酸酶水，涡旋混匀，短暂离心。
 - 室温孵育 2 min，放置磁力架上，待溶液澄清后，取上清（约 13 μ L）至新的 PCR 管中，放置冰上。
- ### 2.6 将纯化后的预文库使用 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 试剂盒进行浓度测定。
- 若预文库总量 ≥ 500 ng，质控合格；
若预文库总量 < 500 ng，质控不合格，需重建文库并质检，若预文库总量再次不合格，检测中止。

注：预文库如不立即进行实验，应置于-20℃保存，保存时间不长于6个月。

3. 杂交反应阶段：

3.1 按照下表对杂交用各组分进行准备：

表4 杂交试剂准备

编号	试剂名称	包装盒编号	准备方式
A3	DBM 阻断剂 1	试剂盒 1	冰上解冻
A4	Hyb 缓冲液	试剂盒 1	室温放置
A5	RBM 阻断剂 2	试剂盒 1	冰上放置
A6	探针 LC001	试剂盒 2	冰上解冻

3.2 根据预文库的总量，按照如下要求配制样本管（A管）：

- 500 ng ≤ 预文库总量 < 750 ng，取全部预文库（约 12 μL）投入杂交。
- 预文库总量 ≥ 750 ng，取 750 ng 用无核酸酶水补至终体积约 12 μL 投入杂交。

表5 样本管（A管）配制体系

试剂名称	1 个反应（μL）
预文库	12
DBM 阻断剂 1	5
总量	17
用移液器上下吹打 8-10 次，涡旋混匀，短暂离心。	

3.3 按下表配制探针管（B管）：

表6 探针管（B管）配制体系

试剂名称	1 个反应（μL）
探针 LC001	1
Hyb 缓冲液	6
RBM 阻断剂 2	0.5
无核酸酶水	4.5
总量	12
涡旋混匀，放置冰上备用。	

3.4 将配制好的 A 管放入 PCR 仪，按如下设置程序，终反应体积设置为 29 μL，点击启动。

表7 杂交反应程序

阶段	循环数	温度条件	反应时间
1	1	95℃	5 min
2	1	65℃	10 min
3	1	65℃	1 min
暂停反应，将 B 管 12 μL 加至 A 管中，用移液器上下吹打 8-10 次（在 PCR 仪上操作），混合后盖好密封，放于涡旋混匀仪上涡旋 5 s，短暂离心，放回 PCR 仪上点击启动。			
4	60	65℃	1 min
		37℃	3 s
5	1	65℃	Hold

4. 捕获反应阶段：

4.1 按照下表对捕获用各组分进行准备：

表8 捕获试剂准备

编号	试剂名称	包装盒编号	准备方式
A7	链霉亲和素磁珠	试剂盒 3	室温平衡
A8	结合缓冲液	试剂盒 4	室温备用
A9	WB 清洗液 1	试剂盒 4	室温备用
A10	WB 清洗液 2	试剂盒 4	65℃ 预热

4.2 将室温平衡的链霉亲和素磁珠涡旋混匀后，取 50 μL 于新的 1.5 mL 离心管中，向该管中加入 200 μL 结合缓冲液，移液器上下吹打 10 次，短暂离心后放置于磁力架上静置至少 1 min，澄清后弃上清液。重复清洗二次，共计三次，然后再加入 200 μL 结合缓冲液重悬磁珠备用。

4.3 将杂交结束样本转移至室温，短暂离心后，吸取全部杂交样本加入清洗完成的磁珠混悬液中。用移液器上下吹打 10 次混匀，置于低转速旋转混匀仪上室温孵育 30 min（若无旋转混匀仪，可每 5-10 min 上下颠倒几次，保证磁珠不沉底即可）。短暂离心，放置于磁力架上静置至少 1 min，待澄清后弃去上清。

4.4 向磁珠反应管中加入 200 μL WB 清洗液 1，吹打 8-10 次，确保磁珠悬浮。短暂离心，放置于磁力架上静置至少 1 min，待澄清后弃去上清。

4.5 向磁珠反应管中加入 200 μL 预热至 65℃ 的 WB 清洗液 2，上下吹打至少 10 次确保磁珠重悬，短暂离心后于 65℃ 孵育 10 min。放置于磁力架上静置至少 1 min，待澄清后弃去上清。

4.6 重复步骤 4.5 洗脱二次，共计三次。最后一次弃去上清后，短暂离心放置于磁力架上静置 30 s，并吸去残留液体。

4.7 加 30 μL 已恢复至室温的无核酸酶水，混匀，放置冰上备用。

5. 上机前处理阶段：

5.1 文库富集和加标签

- 按照下表冰上配制 PCR 反应体系 2。

表9 杂交捕获后 PCR 反应体系 2

试剂名称	1 个反应（μL）
无核酸酶水	16.5
扩增缓冲液	10
dNTP 混合液	0.5
扩增反应液	1
合计	28

- 向上述反应体系 2 中加入 20 μL 带有链霉亲和素磁珠的样本。
- 加 1 μL 引物 P7（根据上机样本数量选择合适序号的标签）。
- 加 1 μL 引物 P5（根据上机样本数量选择合适序号的标签）。
- 上下吹打混匀，确保磁珠重悬，放置于 PCR 仪上进行反应【反应程序：98℃ 2 min；（98℃ 30 s，58℃ 30 s，72℃ 1 min）14 cycles；72℃ 5 min；4℃ Hold；热盖 105℃】。

5.2 磁珠纯化

- 充分混匀已平衡至室温的纯化磁珠，取 60 μL 至新的 1.5 mL 离心管中。
- 将 PCR 反应产物置于磁力架上，吸取上清加入到上述纯化磁珠中，混匀，置于低转速旋转混匀仪上室温孵育 5 min（若无旋转混匀仪，可每分钟上下颠倒几次，保证磁珠不沉底即可）。
- 同上述步骤 2.3 的 c-h 操作。
- 加入 20 μL 已恢复至室温的无核酸酶水，涡旋混匀，短暂离心。
- 室温孵育 2 min，放置磁力架上，取上清（约 18 μL）至新的 1.5 mL 离心管。

5.3 将纯化后的文库使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 和 Agilent High Sensitivity DNA Kit 或 Agilent DNA 1000 Kit 分别对其浓度和片段长度进行质控。

若文库浓度 ≥ 0.5 ng/μL，片段长度分布在 280-500 bp，质检合格；若文库浓度 < 0.5 ng/μL，或片段长度分布超出 280-500 bp，重复建库并质检，若再次不合格，检测中止。

注：文库如不能立即测序，应置于-20℃保存，保存时间不长于6个月，且保存期间避免反复冻融，冻融不得超过4次。

6. 测序阶段：

6.1 文库混合：将待测序文库混合至终浓度为 4 nM，根据以下公式进行混样： $V_n = V(f) \times C(f) / (\# \times C(i))$

注：其中 V_n 是每一个 index 文库的所需体积； $V(f)$ 是混合后的文库总体积； $C(f)$ 是混合后的所有文库的终浓度； $\#$ 是 index 文库的数目； $C(i)$ 是每一个 index 文库的初始浓度；最后以稀释缓冲液补足至终体积。

- 6.2 变性试剂准备 (0.2 mol/L)：取 10 μ L 2 mol/L 的变性液，加 90 μ L 变性缓冲液，涡旋混匀，短暂离心，备用。
- 6.3 文库变性 (2 nM)：取 5 μ L 文库 (4 nM) 加入 5 μ L 变性液 (0.2 mol/L) 至管底，吹打 2-3 次；开始计时 5 min，期间涡旋 2 次，放置室温静置，变性 5 min 后立即放置冰上。
- 6.4 文库准备 (20 pM)：将步骤 6.3 中 2 nM 变性后的文库补加 990 μ L 稀释缓冲液，涡旋混匀，短暂离心，备用。
- 6.5 稀释文库至上机工作浓度：选择合适的文库上机浓度，按照下表进行稀释。根据产品性能要求，每个样本的数据量应 ≥ 0.09 G。

表 10 工作液稀释

文库上机浓度	稀释至 600 μ L
14 pM	420 μ L 文库 (20 pM) + 180 μ L 稀释缓冲液
16 pM	480 μ L 文库 (20 pM) + 120 μ L 稀释缓冲液
18 pM	540 μ L 文库 (20 pM) + 60 μ L 稀释缓冲液

- 6.6 定制引物稀释：用稀释缓冲液将定制引物 Read 1 Primer、Index Primer 和 Read 2 Primer 分别稀释成 600 μ L 0.5 μ M 的工作液，按照如下步骤进行：
 - a. 引物 C1 (Read 1 Primer) 稀释：3 μ L 引物 C1 (100 μ M) + 597 μ L 稀释缓冲液，混匀。
 - b. 引物 C2 (Index Primer) 稀释：3 μ L 引物 C2 (100 μ M) + 597 μ L 稀释缓冲液，混匀。
 - c. 引物 C3 (Read 2 Primer) 稀释：3 μ L 引物 C3 (100 μ M) + 597 μ L 稀释缓冲液，混匀。
- 6.7 装入文库和 primer：使用干净的 1 mL 枪头扎穿 17 号、18 号、19 号和 20 号孔的封口膜，将 600 μ L 上机文库加入 17 号孔；将 600 μ L 的 Read 1 Primer、Index Primer 和 600 μ L 的 Read 2 Primer 分别加入 18、19、20 号孔。
- 6.8 上机测序：将上述已装入文库和 primer 的测序试剂盒用 Illumina 公司生产的基因测序仪 MiSeqDx 上机测序。
- 6.9 上述步骤是根据基因测序用测序试剂盒（广州燃石医学检验有限公司生产）说明书进行测序，如使用其它推荐配套使用的测序试剂盒，需参考相应试剂盒的说明书操作。

7. 生物信息分析：

将测序获得的序列信息数据传输至《肿瘤个体化二代测序数据分析系统》（广州燃石医学检验有限公司生产）运行分析比对，获得判读结果。

【数据分析和阳性判断值】

本产品结果分析采用《肿瘤个体化二代测序数据分析系统》（以下简称分析系统）对原始数据进行分析。分析系统实现从 MiSeqDx 原始数据下机到报告的自动化分析。相关数据分析流程和阳性判断值如下：

- 1、数据预处理：使用 Illumina Sequencing Analysis Viewer v2.4.5 软件分析每批次数据测序质量 Q30 碱基占比，如批次数据 Q30 碱基占比 $\geq 75\%$ 则质控通过；如批次数据 Q30 碱基占比 $< 75\%$ ，则质控不通过。然后使用 Illumina 公司的 bcl2fastq v2.19 软件将 MiSeqDx 测序生成的 bcl 文件转化成样本对应的 fastq 文件。使用分析系统的数据预处理模块（基于 Trimmomatic-0.36 软件）去除建库过程中引入的接头序列以及低质量碱基片段（尾部 8 个碱基平均质量小于 20 的部分片段以及长度小于 50bp 的短片段）。

- 2、数据比对：使用分析系统的序列比对模块（基于 bwa v0.7.10 和 GATK v3.2-2 软件）将 fastq 文件中的碱基序列比对至 hg19 (GRCh37)

人类参考基因组上生成 bam 文件，并根据基因组坐标对 bam 文件进行排序，然后对基因组复杂区域进行序列比对优化。

- 3、数据质控：使用分析系统的数据质控模块计算每个样本的 Q30 碱基占比、序列比对至参考基因组比例、建库复杂度、目标区域的中位测序深度等参数。如果 Q30 碱基占比 $\geq 80\%$ ，序列比对至参考基因组比例 $\geq 90\%$ ，建库复杂度 $\geq 20\%$ ，中位测序深度 $\geq 500X$ ，则样本数据质控通过；否则样本数据质控不通过。如数据质控不通过，则实验失败，要重新实验。

- 4、突变分析：使用分析系统的变异鉴定模块（基于 varscan v2.3.9 软件）分析样本中的点突变和插入缺失突变，使用分析系统的融合分析模块（基于 factera v1.4 软件）分析样本中的重排（融合），分析参数设置要求位点覆盖深度 $\geq 100X$ ，序列比对质量 ≥ 60 ，碱基质量 ≥ 30 。

- 5、突变注释：使用分析系统的注释模块（基于 ANNOVAR v20150617 软件和 snpEff v4.2 软件）对鉴定出的点突变、插入缺失和基因重排（融合）进行 HGVS 格式和 COSMIC 数据库 (v69) 注释。

- 6、阳性判断标准：经过以上 1-5 步分析流程处理后，符合质量指标要求的突变结果进行阴/阳性判断。如突变的双端支持（即正向和反向序列支持）的独特（即去除 PCR 重复）DNA 片段 ≥ 2 时，判断为阳性；反之，则判断为阴性。

【检验结果的解释】

检测结果分析判定方法如下：

1. 阴性质控品 (NC) 的检测结果为阴性，若其中有突变检出，说明环境中可能存在 DNA 污染源。
2. 阳性质控品 (PC) 的检测结果为 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变对应阳性，如果突变未检出，说明试剂盒性能不理想或操作过程有误，此次检测结果无效。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断使用，结果仅供临床参考，不可作为临床诊治的唯一依据。
2. 阴性结果不能完全排除靶基因突变的存在，样本中肿瘤细胞过少、过度降解、突变类型不在试剂盒检测范围内或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成假阴性结果。
3. 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导致错误的结果。
4. 使用本产品对临床样本进行检测，为了使 DNA 投入量和体积符合反应体系的要求，在核酸提取过程中可能涉及到浓缩操作，如操作不当，会对 DNA 的质量或稳定性造成影响。
5. 肿瘤组织可能存在较大异质性，不同部位取样可能会得到不同的检测结果。
6. 本试剂盒仅用于检测保存年限不超过 2 年的非小细胞肺癌石蜡组织样本，超过 2 年的石蜡组织样本，其提取的 DNA 的检测结果可能受影响。

【产品性能指标】

1. 阳性参考品符合率：检测人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）检测范围内的 15 份阳性参考品，检测结果分别为对应的突变型，即阳性参考品符合率为 100%。
2. 阴性参考品符合率：检测人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）检测范围 13 份阴性参考品，检测结果应均为阴性，阴性符合率 100%。
3. 重复性：检测人 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因突变联合检测试剂盒（可逆末端终止测序法）检测范围内的 5 份重复性参考品（包含 EGFR/ALK/BRAF/KRAS 基因的不同突变类型），重复检测 10 次，检测结果应一致，分别为对应的突变型。
4. 最低检出限：能够检测出 50ng DNA 样本中突变频率低至 2% 的 EGFR/BRAF/KRAS 基因突变和突变频率低至 10% 的 ALK 基因重排（融合）突变。
5. 干扰分析：评估 FFPE 样本处理过程中可能受福尔马林、石蜡、人总蛋白、乙醇的影响。均使用相应的最高浓度（0.006% 福尔马林、1%

石蜡、400 ng/μL 总蛋白、1%乙醇）加入样本反应物质中，检测最低检出限参考品符合率为100%。

6. 临床试验结果

(1) 临床试验在5家临床机构共同开展，共计完成有效样本1460例，其中1334例非小细胞肺癌样本（包含腺癌、鳞癌、腺鳞癌、神经内分泌癌、大细胞癌等）和126例干扰样本，样本类型为石蜡包埋组织。分别考察EGFR、BRAF、KRAS以及ALK基因的多个突变类型，本试剂盒共检测出963例突变阳性样本。与对比方法相比，4种基因各突变位点的定性检测结果阳性符合率均大于95%，阴性符合率均大于95%，总符合率均大于95%。经卡方检验，结果均显示两者具有较好的检测一致性。

(2) 回溯性样本药效研究共计86例有效样本，其中既往治疗中使用靶向吉非替尼片（易瑞沙）治疗29例、盐酸埃克替尼片（凯美纳）21例、克唑替尼胶囊（赛可瑞）13例、甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）13例，本试剂盒检测结果与回溯性病例用药前靶点检测结果均一致，且各靶点人群接受相应靶向药物治疗的客观缓解率均达到了预期临床疗效，结果表明本试剂盒可以帮助NSCLC患者选择上述靶向药物的肿瘤靶向治疗方式。

(3) 用已上市的伴随诊断试剂进行比较研究，考察 EGFR 基因和 ALK 基因的多个突变类型，与对比方法相比，EGFR 基因各位点和 ALK 基因的定性检测结果，阳性符合率均大于95%，阴性符合率均大于99%。经卡方检验，结果均显示两者具有较好的检测一致性。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外辅助诊断，实验前请仔细阅读本说明书。
2. 临床基因扩增实验室及实验室操作人员资质应当严格遵循《医疗机构临床基因扩增管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号）。
3. 标本的处理和检测标本的容器、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。
4. 所有化学药品都具有潜在的危险性。只有经过培训，具有相应实验室技术的人员才能使用本试剂盒。操作时，请穿着合适的实验室工作服、并佩戴一次性手套。使用过的试剂盒为医疗废弃物，应该妥善处理。

【参考文献】

1. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Non-Small Cell Lung Cancer (Version 3.2018).
2. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 原发性肺癌诊疗指南 (2017.V1) .
3. Sharma SV, et al. Epidermal growth factor receptor mutations in lung cancer. Nat Rev Cancer. 2007;7(3):169-181.
4. Janne PA, et al. AZD9291 in EGFR inhibitor-resistant non-small-cell lung cancer. N Engl J Med 2015;372:1689-1699.
5. Scagliotti G, et al. ALK translocation and crizotinib in non-small cell lung cancer: An evolving paradigm in oncology drug development. Eur J Cancer. 2012;48(7):961-973.
6. Tisot C, et al. Clinical characteristics and outcome of patients with lung cancer harboring BRAF mutations. Lung Cancer. 2016;91:23-28.
7. Planchard D, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. Lancet Oncol 2016;17:984-993.
8. Planchard D, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAFV600E-mutant metastatic non-small-cell lung cancer: an open-label, phase 2 trial. Lancet Oncol.
9. Finberg KE, et al. Mucinous differentiation correlates with absence of EGFR mutation and presence of KRAS mutation in lung adenocarcinomas with bronchioloalveolar features. J Mol Diagn 2007;9:320-326.

10. Massarelli E, et al. KRAS mutation is an important predictor of resistance to therapy with epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitors in non-small-cell lung cancer. Clin Cancer Res. 2007; 13(10):2890-2896.

11. Slebos RJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med 1990;323:561-565.

【基本信息】

名称：广州燃石医学检验所有限公司

住所：广州国际生物岛螺旋四路7号3栋第六层601房

电话：020-34037871 传真：020-34037872

网址：www.brbiotech.com E-mail: info@brbiotech.com

生产地址：广州国际生物岛螺旋四路7号3栋第二层202房；

广州国际生物岛螺旋四路7号3栋第六层601房。

医疗器械生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准及修改日期】

附表：本产品可检测突变类型列表

基因名称	外显子	突变	Cosmic ID	HGVS格式
EGFR	21	L858R	COSM6224	NM_005228.3(EGFR):c.2573T>G (p.Leu858Arg)
	20	T790M	COSM6240	NM_005228.3(EGFR):c.2369C>T (p.Thr790Met)
	19	Exon19 Deletion*	不适用	19号外显子缺失*
	20	S768I	COSM6241	NM_005228.3(EGFR):c.2303G>T (p.Ser768Ile)
KRAS	2	G12V	COSM520	NM_033360.3 (KRAS):c.35G>T (p.Gly12Val)
	2	G12S	COSM517	NM_033360.3 (KRAS):c.34G>A (p.Gly12Ser)
	2	G12C	COSM516	NM_033360.3 (KRAS):c.34G>T (p.Gly12Cys)
	2	G12R	COSM518	NM_033360.3 (KRAS):c.34G>C (p.Gly12Arg)
	2	G12D	COSM521	NM_033360.3 (KRAS):c.35G>A (p.Gly12Asp)
	2	G12A	COSM522	NM_033360.3 (KRAS):c.35G>C (p.Gly12Ala)
	2	G13D	COSM532	NM_033360.3 (KRAS):c.38G>A (p.Gly13Asp)
	NA	Exon19-Exon20 Translocation*	不适用	(19号外显子至20号外显子范围内的重排（融合）)*
ALK	NA	Exon19-Exon20 Translocation*	不适用	(19号外显子至20号外显子范围内的重排（融合）)*
BRAF	15	V600E	COSM476	NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p.Val600Glu)
* 可检测多种相关突变或基因重排				