

受理号：CSZ1700089

体外诊断试剂产品注册 技术审评报告

产品中文名称：人EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA、ALK、ROS1基因
突变检测试剂盒（半导体测序法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：天津诺禾致源生物信息科技有限公司

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	7
三、 临床评价摘要	14
四、 风险分析及说明书提示	22
综合评价意见.....	27

基本信息

一、申请人名称

天津诺禾致源生物信息科技有限公司

二、申请人住所

天津市武清开发区创业总部基地 B07-B09

三、生产地址

天津市武清开发区创业总部基地 B07-B09

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

试剂盒名称	组分名称	规格	数量
文库构建试剂盒	反转录缓冲液	106 μ L/管	1管
	反转录酶混合液	53 μ L/管	1管
	PCR酶混合液	423 μ L/管	1管
	消化酶	212 μ L/管	1管
	DNA连接酶	212 μ L/管	1管
	DNA连接酶缓冲液	423 μ L/管	1管
	DNA阳性质控品	5 μ L/管	1管
	RNA阳性质控品	5 μ L/管	1管
	DNA阴性质控品	5 μ L/管	1管
	RNA阴性质控品	5 μ L/管	1管
	DNA扩增引物混合液	212 μ L/管	1管
	cDNA扩增引物混合液	212 μ L/管	1管
	P1接头	53 μ L/管	1管
特异性接头1-48	2 μ L/管	48管	
文库定量试剂盒	文库定量混合液	1130 μ L/管	1管
	文库定量探针反应液	113 μ L/管	1管
	文库定量标准品	20 μ L/管	1管
模板制备试剂盒	乳液PCR缓冲液	2mL/管	2管
	乳液PCR酶反应液	264 μ L/管	1管
	模板载体溶液	220 μ L/管	1管
模板制备溶液盒	模板制备油	60mL/瓶	2管
	破乳液	660 μ L/管	1管
	模板反应油	440 μ L/管	1管
	无核酸酶水	8mL/瓶	1管
	吐温溶液	616 μ L/管	1管
	模板回收液	47.5mL/瓶	1管
	模板清洗液	2mL/管	1管
	C1磁珠清洗液	1.1mL/管	2管
	C1磁珠重悬液	286 μ L/管	1管
耗材盒	模板重悬液	176 μ L/管	1管
	扩增板	1块/袋	2袋

测序试剂盒	模板制备过滤器	1个/袋	2袋
	芯片	1片/袋	2袋
	dGTP	80μL/管	1管
	dCTP	80μL/管	1管
	dATP	80μL/管	1管
	dTTP	80μL/管	1管
	测序酶溶液	14μL/管	1管
	测序引物	44μL/管	1管
测序溶液盒	质控模板	12μL/管	1管
	测序溶液B	125mL/瓶	1瓶
	测序溶液C	60mL/瓶	1瓶
	退火缓冲液	1.2mL/管	2管
	载样液	24μL/管	1管
	发泡剂	4μL/管	1管
	清洗片剂	1片/袋	1袋
	文库纯化磁珠	5mL/瓶	1瓶
	文库洗脱液	5.5mL/瓶	1瓶
C1磁珠	220μL/管	1管	

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

该产品用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）肿瘤组织福尔马林固定石蜡包埋切片（FFPE）样本中 EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA、ALK、ROS1 基因的多种变异。其中 EGFR 基因的 L858R 及 19 号外显子缺失（19del）突变用于吉非替尼片的伴随诊断检测，T790M 突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测，ALK 融合和 ROS1 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

靶向药物	基因及变异类型
吉非替尼片	EGFR: 19del、L858R
甲磺酸奥希替尼片	EGFR: T790M
克唑替尼胶囊	ALK融合、ROS1融合

表 3 中为该产品的可以检出，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	L861Q, S768I, 20ins, G719X
BRAF	V600E
KRAS	G12X, G13D
PIK3CA	E542K, E545K, H1047R, H1047L

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

48 测试/盒。

(四) 产品检验原理

该产品采用多重 PCR 捕获技术和半导体测序技术，对非小细胞肺癌（NSCLC）肿瘤组织福尔马林固定石蜡包埋切片（FFPE）样本中提取的脱氧核糖核酸（DNA）及核糖核酸（RNA）进行提取纯化，然后采用多重 PCR 技术富集目标区域的 DNA 和 cDNA 片段，并对富集后的文库进行定量与质控，最后将经定量的文库用基因测序仪（型号：DA8600，中山大学达安基因股份有限公司生产，注册证号：国械注准 20143401961）进行高通量测序，从而得出目标区域的 DNA 和 RNA 序列信息，通过配套软件与人类基因组数据库进行比对判断是否发生突变或融合。

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:DNA 扩增引物混合液、cDNA 扩增引物混合液、阴阳性质控品、反转录酶、DNA 连接酶、PCR 酶、测序芯片等,这些原材料均为外购方式获得。DNA 和 cDNA 扩增引物混合液均为申请人自行设计后由专业的供应商合成、修饰、纯化后获得;阴阳性质控品由细胞系供应商提供,并由申请人提取 DNA 和 RNA 定量稀释后制得;其它原材料均为供应商按照原材料技术要求提供。申请人对主要原材料进行了供应商选择,通过功能性试验,筛选出最佳原材料供应商,制定了各主要原材料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

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和重复性参考品。其中:

阳性参考品共 39 份,涵盖了该产品可检出的所有突变或融合,其中 22 份来自于临床样本(19 份 DNA 样本,3 份 RNA 样本),其余来自于购买的细胞系(13 份 DNA 样本,4 份 RNA 样本)。这 39 份参考品均用数字 PCR 和 NGS 方法验证并确定了突变频率或融合拷贝数。

阴性参考品共 12 份,包括 1 份大肠杆菌样本,2 份正常

人血液样本，1份人类野生型细胞系样本和8份携带待测基因检测范围外突变的临床样本（其中EGFR突变样本2份，KRAS突变样本2份，PIK3CA突变样本1份，BRAF突变样本1份，ALK融合样本1份，ROS1融合样本1份）。这12份样本均用数字PCR和NGS方法验证为相关突变阴性。

检测限参考品总共39份，为阳性参考品在相关检测项目进行前以阴性参考品中的人类野生型细胞系样本核酸稀释获得，涵盖了该产品可检出的所有突变或融合。DNA检测限参考品稀释后突变频率为5%；RNA检测限参考品稀释后融合拷贝数为100融合拷贝/30ng。

重复性参考品总共4份（DNA样本3份，RNA样本1份），每份重复性参考品由2份阳性参考品等质量混合而成，即每份重复性参考品携带两种待测突变或融合。重复性参考品涵盖了可检测的所有突变或融合类型。

该产品的阴阳性质控品来源于细胞系样本的核酸，其中DNA阳性质控品来源于细胞系H1975的DNA，携带EGFR基因L858R和T790M突变，RNA阳性质控品来源于细胞系H2228的RNA，携带ALK基因融合，两份阴性质控品来源于H1299细胞系的DNA和RNA。阴阳性质控品均经数字PCR方法验证基因变异情况，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

（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对反应体系中的反转录试验时间、PCR 酶配制比例、合适的扩增引物混合液用量、DNA/RNA 模板用量、PCR 循环数、DNA/cDNA PCR 退火延伸时间和温度、接头用量、DNA 连接酶连接时间、4 种碱基浓度、模板制备上样量等进行筛选和优化，通过功能性试验，最终确定了最佳的反应体系。

（三）分析性能评估

分析性能评估内容包括阴阳性参考品符合率、分析灵敏度（检测限）、分析特异性和干扰物质、重复性、核酸提取纯化配套试剂组合性能研究等。

在阴阳性参考品符合率实验中，采用 39 个阳性参考品和 12 个阴性参考品对 3 批成品试剂盒（15062901、15072401、15082001）进行了检测验证，检测结果均为预期的突变型，说明阳性参考品符合率和阴性参考品符合率均为 100%。

在分析灵敏度（检测限）实验中，分别对阳性参考品提取的核酸在阴性参考品中人类野生型细胞系样本提取的核酸背景下配制了每种突变类型的 4 级频率梯度，每级梯度 10 次重复，进行了梯度检测试验，通过回归分析初步确定了 DNA 样本的检测限为可检测 10ng DNA 中频率低至 5% 的突变（包括点突变和插入缺失突变），RNA 样本的检测限为可

检测 30ng RNA 中低至 100 个的融合拷贝。然后申请人配制了包含全部 39 种变异检测的检测限参考品，用 3 批成品试剂盒（15062901、15072401、15082001）各进行了 20 次重复检测验证，结果均能正确检出。最终确定该产品不低于 95% 检出率时可检测 10ng DNA 中频率低至 5% 的突变（包括点突变和插入缺失突变），30ng RNA 中低至 100 个的融合拷贝。

在分析特异性实验中，申请人通过对 8 份容易发生交叉反应的阴性参考品（其中 EGFR 突变样本 2 份，KRAS 突变样本 2 份，PIK3CA 突变样本 1 份，BRAF 突变样本 1 份，ALK 融合样本 1 份，ROS1 融合样本 1 份）进行检测，检测结果均为阴性，说明这些容易发生交叉反应的突变不会对该产品的检查结果产生影响。

在干扰物质实验中，申请人在阳性参考品和检测限参考品中分别加入如下干扰物质：胆红素（342 $\mu\text{mol/L}$ ）；甘油三酯：（37 mmol/L）；血红蛋白：（2 g/L）；石蜡（等体积）；肺炎链球菌 DNA（ 1×10^6 拷贝）；肺炎克雷伯氏菌 DNA（ 1×10^6 拷贝）；坏死组织（等体积）；福尔马林（等体积）及乙醇（等体积）然后进行检测，样本均能检出相应突变，说明这些干扰物质在不高于上述浓度的情况下不会对该产品的检查结果产生影响。

在重复性实验中，申请人针对重复性参考品、代表每种

突变类型的共 7 份检测限参考品及阴性参考品，使用 3 批成品试剂盒（15062901、15072401、15082001）各进行了至少 6 次重复性检测，进行了批内一致性、日间一致性、批间一致性、不同操作者一致性和不同测序仪一致性的研究，结果显示上述一致性均为 100%。

针对核酸提取纯化步骤，申请人比较了 6 种试剂盒的提取效果，根据与该产品的组合性能研究结果，确定了 3 种核酸提取试剂作为样本提取的推荐试剂盒。

（四）阳性判断值

申请人首先采用少量临床样本，通过模拟的方法对 DNA 和 RNA 的阳性判断值进行了初步确定，然后对临床试验中收集的大量临床样本进行阳性判断值验证，最终确定了配套软件中的阳性判断值标准。

对于 DNA 的阳性判断值，申请人选取了两份低频突变临床样本，对样本原始数据分别随机抽取测序深度为 500×, 1000×, 2000×, 3000×, 4000×各 100 次进行点突变频率及缺失或插入频率的统计，检测结果显示测序深度在 2000×时采用点突变频率 0.7% 及缺失或插入频率 1% 为阳性判断值可以有效检出突变。然后申请人对临床试验中收取的 1524 例临床样本按照 Sanger 测序突变检测结果分为阴性和阳性两组，统计它们的点突变频率及缺失或插入频率。结果显示，采用既定的分析频率为阳性判断值可以正确区分样本突变的定

性结果。

对于 RNA 的阳性判断值，申请人对 6 例临床样本进行了 200 次重复模拟样本的分析，通过统计阳性位点（阳性样本中发生融合的位点）和阴性对照（包括阴性样本及阳性样本中的未发生融合的位点）的序列支持数，初步确定了 RNA 融合阳性判断值为融合序列支持数不低于 200 条。然后申请人对临床试验中收取的 420 例临床样本和 46 例细胞系样本共 466 例样本进行了参数验证。结果显示，采用既定的融合序列支持数为阳性判断值可以正确区分样本融合的定性结果。

通过上述实验，最终确定该产品使用配套软件进行数据分析时的阳性判断值为：

1. DNA 点突变频率大于等于 0.7%；
2. DNA 缺失或插入的频率大于等于 1%；
3. RNA 融合序列支持数为 200 条。

（五）稳定性

申请人对该产品的加速稳定性、实时稳定性、开瓶稳定性、冻融稳定性和运输稳定性进行了研究，确定了在各种条件下该产品的有效保存时间。同时对 FFPE 样本稳定性、核酸（DNA、RNA）冻融稳定性进行了研究，确定了检测过程中各种样本类型的有效保存时间。

加速稳定性研究：采用三批试剂盒（批号：15062901、

15072401、15082001), 将除酶以外的试剂, 放于 37℃ 恒温箱 (0 天、1 天、2 天、3 天、4 天), 对参考品和质控品检出率进行考察, 直至第 3 天各项性能指标均符合要求, 初步确定保存时间为 8 个月到 16 个月之间。

实时稳定性: 采用三批试剂盒 (批号: 15062901、15072401、15082001) 储存于试剂盒标示储存条件下分别在第 0 个月、第 3 个月、第 6 个月、第 8 个月、第 10 个月对参考品和质控品检出率进行考察, 各项性能指标均符合要求, 确定产品标示保存条件为文库构建试剂盒、文库定量试剂盒、模板制备试剂盒、测序试剂盒储存于 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$; 测序溶液盒储存于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$, 测序溶液 B 避光保存; 模板制备溶液盒、耗材盒储存于 $15^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$; 有效期确定为 9 个月。

开瓶稳定性: 采用三批试剂盒 (批号: 15062901、15072401、15082001) 在超净工作台中打开试剂瓶盖室温放置 2 小时, 然后盖好盖子, 放入试剂盒规定储存温度 > 16 个小时为一个周期, 开一次瓶以后每隔 1 个月检测一次 (从第 3 个月到第 5 个月), 对参考品和质控品检出率进行考察, 在检测各项性能指标均符合要求, 确定试剂盒开瓶后有效期为 4 个月。

冻融稳定性: 采用三批试剂盒 (批号: 15062901、15072401、15082001) 在超净台中至完全融化 (时间 > 2 小时), 然后放入规定储存温度中 (> 16 小时) 为一个周期,

每次冻融后均对参考品和质控品检出率进行考察，共冻融 6 次，6 次检测各项性能指标均符合要求，确定试剂盒的冻融次数为 5 次。

运输稳定性：采用三批试剂盒（批号：15062901、15072401、15082001）按运输要求运到广州后再发回公司，然后按要求储存至效期末，在运输前、返回公司后、储存至效期末时分别对参考品和质控品检出率进行考察，各项性能指标均符合要求，说明按照运输条件运输，对试剂盒没有影响，确定了该产品的运输条件。

申请人对 FFPE 样本稳定性、核酸（DNA、RNA）样本冻融稳定性也进行了研究。研究确认石蜡组织样本保存期限可达到 22 个月；核酸（DNA、RNA）样本冻融 4 次后检测依然正常。

三、临床评价摘要

（一）与 Sanger 测序的比较研究

申请人在北京大学肿瘤医院，四川大学华西医院，中国人民解放军总医院，河南省肿瘤医院和首都医科大学附属北京胸科医院共 5 家临床研究机构完成了此项临床研究。采用考核试剂与 Sanger 测序法比较研究试验的方法验证该产品的临床性能。入组样本为回顾性非小细胞肺癌 FFPE 样本和近期临床常规病理检测剩余的 FFPE 样本。样本总数共计

2789 例。考核试剂与对比试剂检测结果不一致的样本采用相应的已上市 qPCR 试剂盒进行测定。

该临床试验考核试剂共检出 1966 例阳性样本，阳性率（阳性例数占总样本例数的比例）为：70.49%。其中，1521 例 EGFR 基因突变阳性样本，166 例 KRAS 基因突变阳性样本，43 例 BRAF 基因 V600E 突变阳性样本，99 例 PIK3CA 基因突变阳性样本，112 例 ALK 基因融合阳性样本，25 例 ROS1 基因融合阳性样本。

与 Sanger 测序的比较研究结果显示，考核试剂 EGFR 基因突变的阳性符合率（95%置信区间）为 100.00%（99.75% -100.00%），阴性符合率（95%置信区间）为 97.84%（97.05%-98.63%），总符合率（95%置信区间）为 99.00%（98.63%-99.37%）；KRAS 基因突变的阳性符合率（95%置信区间）为 100.00%（97.73%-100.00%），阴性符合率（95%置信区间）为 99.81%（99.56%-99.94%），总符合率（95%置信区间）为 99.82%（99.58%-99.94%）；BRAF 基因 V600E 突变的阳性符合率（95%置信区间）为 100.00%（91.59%-100.00%），阴性符合率（95%置信区间）为 99.96%（99.80%-100.00%），总符合率（95%置信区间）为 99.96%（99.80%-100.00%）；PIK3CA 基因突变的阳性符合率（95%置信区间）为 100.00%（96.07%-100.00%），阴性符合率（95%置信区间）为 99.74%（99.55%-99.93%），总符合率（95%置

信区间)为 99.75% (99.56%-99.93%); ALK 基因融合的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00% (96.27%-100.00%), 阴性符合率(95%置信区间)为 99.44% (99.16%-99.72%), 总符合率(95%置信区间)为 99.46%(99.19%-99.73%); ROS1 基因融合的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00% (86.28%-100.00%), 阴性符合率(95%置信区间)为 100.00% (99.87%-100.00%), 总符合率(95%置信区间)为 100.00% (99.87%-100.00%); 上述结果提示二者具有良好的检测一致性。

在 2789 例样本中, 两种试剂检测结果不一致的样本共 83 例, 涉及 86 个位点, 其中 62 个位点的 qPCR 检测结果与考核试剂一致, 24 个位点的检测结果与 Sanger 测序一致。

(二) 与已上市 qPCR 试剂的比较研究

申请人在北京大学肿瘤医院、四川大学华西医院、河南省肿瘤医院的一致性比较临床研究中, 也检验了考核试剂和相关已上市 qPCR 试剂的检测一致性。入组样本为与 Sanger 测序的一致性临床研究的剩余样本及新入组 FFPE 样本。

EGFR 基因突变对比试验共入组 136 例样本, 对比试剂为人类 EGFR 基因突变检测试剂盒(蝎形探针 ARMS 荧光 PCR 法)(国食药监械(进)字 2014 第 3400761 号)。检测结果显示考核试剂的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00% (91.78%-100.00%), 阴性符合率(95%置信区间)为 100.00%

(96.11%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为100.00% (97.32%-100.00%)，提示二者具有良好的检测一致性。

KRAS 基因突变对比试验共入组 120 例样本，对比试剂为人 **KRAS** 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)(国食药监械(准)字 2013 第 3400175 号)。检测结果显示考核试剂的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00% (92.29%-100.00%)，阴性符合率(95%置信区间)为 100.00% (95.14%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为 100.00% (96.97%-100.00%)，提示二者具有良好的检测一致性。

PIK3CA 基因突变对比试验共入组 124 例样本，对比试剂为人 **PIK3CA** 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)(国食药监械(准)字 2014 第 3401044 号)。检测结果显示考核试剂的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00% (91.40%-100.00%)，阴性符合率(95%置信区间)为 100.00% (95.65%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为 100.00% (97.07%-100.00%)，提示二者具有良好的检测一致性。

BRAF 基因 **V600E** 突变对比试验共入组 119 例样本，对比试剂为人 **BRAF** 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)(国食药监械(准)字 2014 第 3401045 号)。检测结果显示考核试剂的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00% (85.18%-100.00%)，阴性符合率(95%置信区间)为 100.00% (96.23%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为 100.00%

(96.95%-100.00%)，提示二者具有良好的检测一致性。

ALK 基因融合对比试验共入组 134 例样本，对比试剂为人类 EML4-ALK 融合基因检测试剂盒（荧光 PCR 法）（国械注准 20173404329）。检测结果显示考核试剂的阳性符合率（95%置信区间）为 98.21%（90.45%-99.95%），阴性符合率（95%置信区间）为 100.00%（95.38%-100.00%），总符合率（95%置信区间）为 100.00%（95.91%-100.00%），提示二者具有良好的检测一致性。

ROS1 基因融合对比试验共入组 146 例样本，对比试剂为人类 ROS1 基因融合检测试剂盒（荧光 PCR 法）（国食药监械（准）字第 2014 第 3401514 号）。检测结果显示考核试剂的阳性符合率（95%置信区间）为 100.00%（94.64%-100.00%），阴性符合率（95%置信区间）为 100.00%（95.44%-100.00%），总符合率（95%置信区间）为 100.00%（97.51%-100.00%），提示二者具有良好的检测一致性。

在以上各基因的试验中，共有 8 例样本两种试剂检测结果不一致。其中 6 例在对比试剂复测及 Sanger 测序中显示突变结果与考核试剂一致，2 例显示与对比试剂检测结果一致。

（三）与伴随诊断试剂的比较研究

申请人在北京大学肿瘤医院、四川大学华西医院、河南省肿瘤医院和首都医科大学附属北京胸科医院的一致性临床研究中，也评估了考核试剂与已经充分联合药物临床评价

的伴随诊断试剂的一致性。入组样本为与 Sanger 测序的一致性临床研究的剩余样本及新入组样本，样本病例肿瘤分期符合相关靶向药物对“局部晚期与转移性非小细胞肺癌”的要求。

针对 EGFR-TKI 药物吉非替尼片敏感突变 EGFR(19del) 和 EGFR(L858R) 的试验中共入组了 203 例样本，对比试剂为人类 EGFR 基因突变检测试剂盒(蝎形探针 ARMS 荧光 PCR 法)；研究结果显示：EGFR(19del) 试验的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00%(95.20%-100.00%)，阴性符合率(95%置信区间)为 100.00%(97.16%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为 100.00%(98.20%-100.00%)；EGFR(L858R) 试验的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00%(95.07%-100.00%)，阴性符合率(95%置信区间)为 100.00%(97.20%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为 100.00%(98.20%-100.00%)，提示二者具有良好的检测一致性。

针对 EGFR-TKI 药物甲磺酸奥希替尼片敏感突变 EGFR(T790M) 的试验中共入组 160 例样本，对比试剂为 cobas EGFR Mutation Test V2；研究结果显示：考核试剂的阳性符合率(95%置信区间)为 100.00%(96.07%-100.00%)，阴性符合率(95%置信区间)为 100.00%(94.72%-100.00%)，总符合率(95%置信区间)为 100.00%(97.72%-100.00%)，提示二者具有良好的检测一致性。

针对 TKI 药物克唑替尼胶囊敏感变异 ALK（融合）的试验中共入组 179 例样本，对比试剂为人类 ALK 基因重组检测试剂盒（荧光原位杂交法）；研究结果显示：考核试剂的阳性符合率（95% 置信区间）为 100.00%（96.31%-100.00%），阴性符合率（95% 置信区间）为 98.77%（93.31%-99.97%），总符合率（95% 置信区间）为 99.44%（96.93%-99.99%），提示二者具有良好的检测一致性。

针对 TKI 药物克唑替尼胶囊敏感变异 ROS1（融合）的试验中共入组 143 例样本，对比试剂为人类 ROS1 基因融合检测试剂盒（荧光 PCR 法）；研究结果显示：考核试剂的阳性符合率（95% 置信区间）为 100.00%（94.48%-100.00%），阴性符合率（95% 置信区间）为 100.00%（95.38%-100.00%），总符合率（95% 置信区间）为 100.00%（97.45%-100.00%），提示二者具有良好的检测一致性。

以上试验中有 1 例样本两种试剂检测结果不一致。对比试剂复测及 Sanger 测序检测显示突变结果与考核试剂一致。

（四）TKI 药物疗效相关的回顾性临床研究

申请人在北京大学肿瘤医院、四川大学华西医院、河南省肿瘤医院和首都医科大学附属北京胸科医院针对“与伴随诊断试剂临床研究”中考核试剂检出的阳性样本，进行了 TKI 药物治疗的回顾性疗效分析研究，共入组 36 例吉非替尼片的有效病例、26 例甲磺酸奥希替尼片的有效病例和 41 例克

唑替尼胶囊的有效病例。

申请人对部分考核试剂检测为吉非替尼片敏感突变 EGFR (19del) 或 EGFR (L858R) 阳性的患者进行了吉非替尼片药物治疗的回顾性疗效分析, 共纳入 36 例非小细胞肺癌 IIIb 或 IV 期的病人 FFPE 样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示为 EGFR (19del) 或 EGFR (L858R) 阳性, 随后服用了吉非替尼片药物治疗, 18 例临床评估为部分缓解, 16 例临床评估为疾病稳定, 客观缓解率 (95% 置信区间) 为 50.00% (33.67%-66.33%), 疾病控制率 (95% 置信区间) 为 94.44% (81.34%-99.32%), 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敏感突变 EGFR (19del) 或 EGFR (L858R) 阳性, 与临床既往分子检测结果一致。

申请人对部分考核试剂检测为甲磺酸奥希替尼片敏感突变 EGFR (T790M) 阳性的患者进行了甲磺酸奥希替尼片药物治疗的回顾性疗效分析, 共纳入 26 例非小细胞肺癌 IIIb 或 IV 期的病人 FFPE 样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示为 EGFR (T790M) 阳性, 随后服用了甲磺酸奥希替尼片药物治疗, 15 例临床评估为部分缓解, 4 例临床评估为疾病稳定, 客观缓解率 (95% 置信区间) 为 57.69% (38.70%-76.68%), 疾病控制率 (95% 置信区间) 为 73.08% (56.03%-90.13%), 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敏感突变 EGFR (T790M) 阳性, 与临床既往分子检测结果一致。

申请人对部分考核试剂检测为克唑替尼胶囊敏感突变 ALK 基因融合或 ROS1 基因融合阳性的患者进行了克唑替尼胶囊药物治疗的回顾性疗效分析, 共纳入 41 例非小细胞肺癌 IIIb 或 IV 期的病人 FFPE 样本。受试者用药前样本靶点检测结果显示为 ALK 基因融合或 ROS1 基因融合阳性, 随后服用了克唑替尼胶囊药物治疗, 22 例临床评估为部分缓解, 17 例临床评估为疾病稳定, 客观缓解率 (95% 置信区间) 为 53.66% (38.39%-68.92%), 疾病控制率 (95% 置信区间) 为 95.12% (83.47%-99.40%), 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敏感突变 ALK 基因融合或 ROS1 基因融合阳性, 与临床既往分子检测结果一致。

综上所述, 考核试剂临床试验资料对该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

(一) 受益评估

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。根据基因突变检测结果的不同，可以对非小细胞肺癌（NSCLC）进行基因分型，不同基因分型的 NSCLC 拥有不同的基因靶点，针对这些基因靶点设计的靶向药物，已经在多个药物临床试验中证实可以用于不同类型的 NSCLC 患者的个体化分子靶向治疗，从而最大限度地延长患者生存期，减少无效治疗，降低毒性反应，改善生活质量。因此，针对 NSCLC 的多基因突变检测，能够提高患者的临床受益。

综合该产品的临床研究，该产品在与 Sanger 测序、已上市 qPCR 试剂、伴随诊断试剂的对比研究中都显示了良好的一致性，为临床判断试剂盒检测范围内的突变提供了可靠的评价方法。在药物疗效相关的回顾性临床研究中，该产品检测靶向药物吉非替尼片、甲磺酸奥希替尼片、克唑替尼胶囊敏感突变的阳性样本，其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，显示该产品可以帮助非小细胞肺癌患者选择上述靶向药物的肿瘤靶向治疗方式。

该产品所采用的测序技术，其通量要远高于 Sanger 测序法等，利用高通量的优势，对样品进行高深度的测序和分析，提高了检测灵敏度（检测限）；与目前临床基因突变检测的 qPCR 法相比，在单个反应中也可以同时检测较多基因突变，具有更高的临床适用性。

(二) 风险评估

1. 假阴性假阳性分析结果导致的风险

该产品检测结果会受到样本来源、样本采集过程、样本异质性、样本运输条件、样本保存条件等因素影响，同时也受到实验环境、操作人员水平、仪器性能等限制，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。

不符合说明书中【样本要求】的样本和不恰当的实验操作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】的要求操作和进行实验过程质控。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验结果。

该产品阴性检测结果不能完全排除基因突变的存在。导致检测结果假阴性的原因可能包括：肿瘤样本中肿瘤细胞较少、肿瘤组织异质性、突变类型不在试剂盒检测范围内、突变频率低于最低检测限、样本降解、样本污染、样本中存在大量干扰物质、不正确的样本保存、不正确的试剂盒保存、试剂盒过期、不恰当的实验操作、等等。

该产品检测过程中涉及 PCR 扩增反应，操作过程中气溶胶泄露可能会导致设备和实验室污染，从而影响检测质量，造成假阳性检测结果。为了尽量避免环境污染对检测质量的影响，检测操作应在可控的基因扩增实验室进行，实验室应

分为三个隔离区域(试剂准备区、样本制备区、扩增监测区),每个区域有专用仪器设备,不能交叉使用;全程使用带滤芯枪头。操作人员需要根据《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。

2. 试验流程和分析方法导致的风险

该产品检测过程主要包括 FFPE 样本中的核酸提取、多重 PCR 捕获、文库制备、测序及数据分析等步骤,检测流程较为复杂。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确定了配套的核酸提取试剂盒并对样本提取质量、文库质量及测序质量进行了研究并确定了质量标准,在检测过程中须严格按质量标准进行质控,并使用该产品说明书推荐的配套试剂进行实验,该产品未对说明书推荐范围以外的其他试剂盒进行配套验证。

为了确保检测结果的准确性,申请人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。请使用该产品配套的分析软件进行数据分析,该产品未对其他软件进行验证。

(三) 其他因素

该产品尚有多个未经伴随诊断验证的基因突变类型,需要在产品上市后继续收集药物疗效相关信息。

(四) 受益 - 风险的确定

通过在说明书等文档中详细规定操作流程和注意事项、对实验人员进行专业培训等防范措施,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：该产品以人类非小细胞肺癌（NSCLC）肿瘤组织福尔马林固定石蜡包埋切片（FFPE）样本中提取的脱氧核糖核酸（DNA）及核糖核酸（RNA）为样本，用于体外定性检测人类 EGFR、KRAS、BRAF、PIK3CA、ALK、ROS1 基因的多种突变与融合。其中 EGFR 19 号外显子缺失（19del）、L858R 突变用于吉非替尼片的伴随诊断检测，T790M 突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测，ALK 融合和 ROS1 融合用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测。该产品检测范围内的其他基因突变均未与靶向药物进行过安全性和有效性的联合临床试验评估，仅进行了性能验证，因此不能用于伴随诊断检测。

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：201700024）。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3种药物（吉非替尼、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。