

受理号：CSZ1900047

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/HER2/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 6840

申请人名称：厦门飞朔生物技术有限公司

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	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：

厦门飞朔生物技术有限公司

二、申请人住所：

厦门市同安区西柯镇西洲路 2041 号四层 401 单元

三、生产地址

厦门市同安区西柯镇西洲路 2041 号四层 401 单元

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

管号	组分名称	主要内容物	颜色	16测试/盒			32测试/盒			备注
				体积	数量	八联管反应条	体积	数量	八联管反应条	
1	Onco-DNA 富集 PCR反应条	引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	蓝色	20 μL	16管	2条	20 μL	32管	4条	每管反应液相同
2	Onco-RNA 富集 PCR反应条	引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	粉色	20 μL	16管	2条	20 μL	32管	4条	每管反应液相同
3	Barcode 1-8 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	紫色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
4	Barcode 9-16 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	绿色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
5	Barcode 17-24 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	白色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
6	Barcode 25-32 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	黄色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
7	RingCap-Taq 酶 (1#)	Taq酶	—	20 μL	1管	—	40 μL	1管	—	—
8	Onco DNA 阴性对照	野生型细胞系 DNA	—	20 μL	1管	—	20 μL	1管	—	—
9	Onco RNA 阴性对照	野生型细胞系 cDNA	—	20 μL	1管	—	20 μL	1管	—	—

10	Onco DNA 阳性对照	突变细胞系DNA	—	20 μL	1 管	—	20 μL	1 管	—	—
11	Onco RNA 阳性对照	突变细胞系cDNA	—	20 μL	1 管	—	20 μL	1 管	—	—

试剂盒具体组成成分、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）组织样本中 EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因突变。其中，EGFR 基因 19 外显子缺失及 L858R 点突变用于吉非替尼片、盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测；ALK 基因融合用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测（表 2）；其余 19 个突变位点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）。

表 2 伴随诊断用途的基因突变类型及相应的靶向药物

靶向药物	基因及突变类型
吉非替尼片	EGFR: 19 外显子缺失、L858R
盐酸埃克替尼片	EGFR: 19 外显子缺失、L858R
克唑替尼胶囊	ALK 融合

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	G719A、G719S、G719C、T790M、V769_D770insASV、H773_V774insH、D770_N771insG
KRAS	G12C、G12S、G12R、G12V、G12D、G12A、G13D
BRAF	V600E
HER2	A775_G776insYVMA
ROS1	CD74-ROS1. C6: R34.、EZR-ROS1. E10: R34.、SLC34A2-ROS1. S4: R32.

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

16 测试/盒、32 测试/盒

(四) 产品检验原理

本试剂盒基于普通PCR平台结合了特异修饰引物和RingCap®环介连接扩增技术，以非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本提取的DNA和RNA为模板，采用特异修饰引物对靶序列进行PCR扩增，扩增产物经磁珠纯化富集后利用RingCap®环介连接扩增技术对扩增产物进行末端修饰、连接特异性序列端、二轮PCR富集扩增，最后经磁珠纯化得到测序文库。测序文库通过基因测序仪DA8600上机检测得到测序数据，经配套的Torrent Suite数据分析软件分析得到基因变异信息。在普通PCR平台上实现对样品核酸中目标序列进行用于高通量测序使用的文库构建，以实现多基因多靶点突变进行准确检测。

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：引物、不对称连接探针、dNTP、RingCap-Taq 酶、阳性对照品、阴性对照品等，这些原材料均为外

购方式获得，引物、不对称连接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

企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、最低检出限参考品和重复性参考品。其中：

阳性参考品共 31 份，包括该产品可检出的所有突变或融合类型，其中 24 份为 DNA 临床样本，7 份为 RNA 临床样本。所有参考品均用 Sanger 测序法、数字 PCR 方法验证。

阴性参考品共 8 份，包括 4 份检测范围内基因变异阴性的临床 DNA 样本以及 4 份检测范围内基因变异阴性的临床 RNA 样本。所有样本均用 Sanger 测序法验证为相关突变阴性。

最低检出限参考品共 31 份，包括该产品可检出的所有突变或融合类型。其中 24 份由 DNA 阳性参考品稀释获得，7 份由 RNA 阳性参考品稀释获得。24 份 DNA 最低检出限参考品稀释后的突变类型变异比例为 5%，7 份 RNA 最低检出限参考品经数字 PCR 仪测定拷贝数后稀释至 20 拷贝/ μL 。

重复性参考品共 3 份，其中 DNA 重复性参考品由临床 DNA 样本根据突变比例混合得到，RNA 重复性参考品由临床 RNA 阳性样品反转录为 cDNA 后等比例混合得到。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配制，对反应体系中的反应总体积、dNTP 浓度、MgCl₂ 浓度、引物浓度、不对称探针浓度、Taq 酶用量、样本的提取、样本用量优化、扩增反应条件等进行筛选和优化，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、最低检出限、分析特异性和干扰物质、重复性、准确性、肿瘤组织细胞含量研究、核酸提取纯化质量评估研究、不同包装规格试剂盒性能说明等。

在阳性参考品符合率试验中，申请人采用 31 份企业阳性参考品和 19 份国家阳性参考品对 3 批成品试剂盒（NG218032701、NG218040301、NG218041601）进行了检测验证，检测结果均为预期的突变型，阳性参考品符合率为 100%。

在阴性参考品符合率试验中，申请人采用 8 份企业阴性参考品和 11 份国家阴性参考品对 3 批成品试剂盒（NG218032701、NG218040301、NG218041601）进行了检测验证，检测结果均为阴性，阴性参考品符合率为 100%。

申请人采用了 3 批成品试剂盒（NG218032701、NG218040301、NG218041601）对 31 份企业最低检出限参考品进行检测验证，结

果均能正确检出；对 39 份国家检出限参考品进行检测验证，结果均为阳性。在 DNA 最低检出限试验中，申请人采用了 10 份临床 DNA 阳性样本，根据荧光计测得的浓度和数字 PCR 测定的样本突变频率，稀释至不同浓度（5 ng/μL、2 ng/μL、1 ng/μL）以及不同突变比例（5%、3%、1%），对每个样本重复测定 20 次，进行最低检测限确认研究，设定了 DNA 样本的最低检出限为 2 ng/μL 样本中 5% 突变比例。在 RNA 最低检出限试验中，申请人采用了 3 份临床样本，经数字 PCR 定量后稀释成 10 拷贝/μL、20 拷贝/μL、50 拷贝/μL，对每个样本重复测定 20 次，确定了 RNA 样本的最低检出限为 50 ng RNA 中 100 拷贝。

在重复性试验中，申请人采用 3 个重复性参考品在 3 批成品试剂盒（NG216010801、NG216011501、NG216012201）上分别由两个实验人员进行 10 天重复性考察，每 2 天对 3 个重复性参考品重复检测 10 次，试剂盒批内、批间、日内、日间、不同操作者之间的变异系数（CV，%）均小于 10%；同时选取了 24 份临床阳性样本在 3 批成品试剂盒上（批号：NG218032701、NG218040301、NG218041601）分别完成 10 次重复检测，检测结果均为相应突变阳性，且变异系数（CV，%）均小于 10%；检测 2 份临床阴性样本，每个样本 DNA 和 RNA 各重复检测 10 次，检测结果均为阴性。

在分析特异性试验中，申请人采用 3 批成品试剂盒（NG218032701、NG218040301、NG218041601）分别检测 18 份检

测范围外的国家阳性参考品，2 例检测范围外的 RNA 融合阳性临床样本以及 4 份微生物基因组 DNA，检测结果均为阴性，表明检测范围外的阳性突变和肺部常见微生物均不会对产品的检测结果产生影响。

在干扰物质试验中，申请人在阳性临床样本中分别加入如下干扰物质：血红蛋白(2g/L)、石蜡(1%V/V)、福尔马林(0.005%V/V)、乙醇(1%V/V)然后进行检测，样本检测结果均与预期一致，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结果产生影响。

在准确性评估试验中，申请人挑选 120 例临床样本，用成品试剂盒进行检测，同时使用已上市的 EGFR、KRAS、BRAF、ALK 基因融合和 ROS1 基因融合联合检测试剂盒和一代测序进行对比实验。试验结果表明阳性样本一致性 100%，阴性样本一致性 100%。

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 $\geq 30\%$ 。

针对核酸提取纯化步骤，申请人采用临床样本，平行比较了 2 种核酸提取试剂盒的提取效果，根据与该产品的组合性能研究结果，确定了 1 种核酸提取试剂作为样本提取的推荐试剂盒。

两种规格试剂盒的性能说明，申请人提供了两种规格的组分，

内包材等的差异说明，证明了两者的包装规格之间不存在性能差异。

(四) 阳性判断值

对于 DNA 的阳性判断值，申请人前期采用了 200 例临床样本进行初步确认，然后对临床试验中收集的 550 例临床样本的试验数据进行补充分析验证。共收集 750 例临床样本的检测数据，分别统计其检出情况及数据质量。通过 ROC 曲线方式确认均以 1% 作为点突变和插入/缺失突变的阳性判断值可以有效区分样本突变的定性结果；数据汇总分析得出 DNA 数据分析质控指标 Uniformity $\geq 75\%$ 、Mean Depth ≥ 1000 ，否则检测结果无效。

此外，根据对试验数据的生物信息学分析研究确认 DNA 分析参数设置时需要在 Analysis Parameters Used 这一模块中添加上 --extra-trim-left 20 的参数指标；在 Torrent Variant Caller 5.4.0 模块将四种变异类型 INDEL、MNP（插入或缺失突变）和 SNP、Hotspot（点突变）的 Minimum allele frequency 调整成 0.01、Minimum coverage 调整成 10、Down sample to coverage 调整成 4000。

对于 RNA 的阳性判断值，申请人对 150 例临床样本进行了检测分析，通过 ROC 曲线方式确认 RNA 样本的阳性判断值为融合序列支持数不低于 200 条，即经 Torrent Suite（版本号 5.4.0）软件分析确认临床样本正反向均有检测到靶向融合序列，且 Total reads ≥ 200 （序列支持数相加大于 200），记录特定融合位点为阳

性。

(五) 稳定性研究

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、热加速稳定性进行了研究，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（NG216010801、NG216011501、NG216012201）储存于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，分别在0、5、7、9和11个月对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检出限和重复性进行考察，结果显示，各项性能指标均符合要求，确定产品在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存9个月。

运输稳定性研究：采用三批试剂盒（NG216010801、NG216011501、NG216012201）按运输要求完成运输试验，然后按要求储存至效期末，在运输前/后、储存至效期末时分别对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检出限和重复性进行考察。结果显示，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：采用三批次试剂盒（NG216010801、NG216011501、NG216012201）反复冻融9次，分别在反复冻融第1、3、5、7和9次后对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检出限和重复性进行考察。结果显示，各项性能指标均符合要求。考虑

到临床实际运用，为保证检测结果的准确性，建议冻融次数不超过 5 次。

开瓶稳定性研究：采用三批次试剂盒（NG216010801、NG216011501、NG216012201）解冻后，拆开包装，将各组分分开盖后再盖紧，于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存 3、6 和 9 个月后对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检出限和重复性进行考察，结果显示，开瓶后的试剂盒在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存至效期内，各项性能指标均能满足要求。

热加速稳定性研究：采用三批次试剂盒（NG216010801、NG216011501、NG216012201）解冻后，放置于 37°C 保存，在第 1、2、3 天对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检出限和重复性进行考察。结果显示，试剂盒在 37°C 加热 3 天，各项性能指标均能满足要求。

申请人对石蜡包埋样本稳定性、核酸（DNA）溶液稳定性、文库稳定性也进行了研究。研究确认石蜡组织样本保存期限不超过 18 个月；核酸（DNA）样本置于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存期限可达到 12 个月且可以反复冻融 5 次；未经稀释的文库可于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 储存 7 天。

三、临床评价摘要

（一）比较研究

申请人在福建医科大学附属协和医院、福建省肿瘤医院、沧州市人民医院共 3 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 1267 例（主要是腺癌和少部分鳞癌、腺鳞癌等），样本类型均为石蜡包埋组织。对比方法选择已上市产品：Oncomine™ Dx Target Test（注册证号：PMA P160045）。考核试剂与对比试剂检测结果不一致的样本采用 Sanger 测序方法进行序列测定。

本临床试验共检测出 748 例突变阳性样本，阳性率为 59.04%，包括 EGFR 基因中 4 例 G719X 突变阳性、247 例 Exon19 Deletion 突变阳性、8 例 20-Ins 突变阳性、247 例 L858R 突变阳性、9 例 L861Q 突变阳性、3 例 S768I 突变；15 例 EGFR 双突变；KRAS 基因中 19 例 G12D 突变阳性、51 例 G12C 突变阳性、23 例 G12V 突变阳性、4 例 G13C 突变阳性、3 例 G12A 突变阳性、1 例 G13D 突变阳性、1 例 G12R 突变阳性、1 例 G12S 突变阳性、2 例 Q61H 突变阳性、1 例 Q61L 突变阳性、1 例 Q12F 突变阳性；HER2 基因中 18 例 A775_G776insYVMA 突变阳性；BRAF 基因中 13 例 V600E 突变阳性；ALK 基因中 51 例 ALK 基因重排（融合）阳性；ROS1 基因中 17 例 ROS1 基因重排（融合）阳性；EGFR/KRAS 双突变 3 例；EGFR/ALK 双突变 4 例；EGFR/ROS1 双突变 1 例；ALK/KRAS 双突变 1 例。

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 99.85% (95%CI: 99.16% ~ 100%); 阴性符合率 100% (95%CI:

99.29%~100%)，总符合率为 99.92% (95%CI: 99.53%~100%)，采用 Kappa 进行统计学分析，Kappa 值为 0.9983>0.75，说明两种方法具有很高的一致性。

在 1267 例样本中，两种方法检测结果不一致的样本共 89 例，87 例样本 sanger 测序方法的检测结果与考核试剂检测结果一致，1 例样本考核试剂 NGS 检出突变位点不在上报范围内，1 例样本疑为在试验过程中某部分指标不符合考核试剂标准，引起两者检测结果的不一。

(二) 伴随诊断比较研究

申请人在福建医科大学附属协和医院、福建省肿瘤医院、沧州市人民医院进行考核试剂与伴随诊断试剂的比较研究。

1. EGFR 基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

EGFR 基因突变对比试剂采用 Life Technologies Corporation 公司生产的 Oncomine™ Dx Test 试剂盒。本次对比研究共纳入 1267 例福尔马林固定石蜡包埋的非小细胞肺癌组织样本。考核试剂共检出突变阳性 541 例。与对比试剂检测结果相比，有 10 例检测结果不一致样本。

考核试剂与对比试剂定性检测 EGFR 基因的阳性符合率为 99.81% (95%CI: 98.96%~100%)，阴性符合率为 98.77% (95%CI: 97.69%~99.44%)，总符合率为 99.21% (95%CI: 98.55%~99.62%)。进行 Kappa 一致性检验，Kappa 值=0.9838>0.75，显示

二者具有很好的检测一致性。

考核试剂与对比试剂定性检测 19-De1 的阳性符合率为 99.61% (95%CI: 97.85% ~ 99.99%), 阴性符合率为 100% (95%CI: 99.64% ~ 100%), 总符合率为 99.92% (95%CI: 99.56% ~ 100%); EGFR L858R 检测结果的阳性符合率为 100% (95%CI: 98.59% ~ 100%), 阴性符合率为 100% (95%CI: 99.63% ~ 100%), 总符合率为 100% (95%CI: 99.71% ~ 100%); EGFR 稀有突变 (包括 T790M、20-Ins、L861Q、S768I 等) 检测结果的阳性符合率为 100.00% (95%CI: 84.56% ~ 100.00%), 阴性符合率为 98.80% (95%CI: 98.02% ~ 99.32%), 总符合率为 98.82% (95%CI: 98.06% ~ 99.34%)。

2. ALK 基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

ALK 基因融合对比试剂采用已上市的 Abbott Molecular, Inc 公司生产的伴随诊断试剂 ALK 基因重组检测试剂盒 (荧光原位杂交法) (国械注进 20143405183)。本次对比研究共纳入 273 例福尔马林固定, 石蜡包埋的晚期非小细胞肺癌组织样本。273 例样本有 272 例考核试剂检测结果与 ALK 基因重组检测试剂盒检测结果一致, 1 例 ALK 基因重组检测结果为野生型, 查看考核试剂检测结果, 该例样本为低频突变。

考核试剂与对比试剂定性检测 ALK 基因的阳性符合率为 100% (95%CI: 93.51% ~ 100%), 阴性符合率为 99.54% (95%CI: 97.47% ~ 99.99%), 总符合率为 99.63% (95%CI: 97.98% ~ 99.99%)。进行

Kappa 一致性检验，Kappa 值=0.9887>0.75，显示二者具有很好的检测一致性。

3. ROS1 基因与已上市伴随诊断试剂盒的比较研究

ROS1 基因突变对比试剂采用 Life Technologies Corporation 公司生产的 Oncomine™ Dx Test 试剂盒。本次对比研究共纳入 1267 例福尔马林固定石蜡包埋的非小细胞肺癌组织样本。考核试剂共检出突变阳性 18 例。

考核试剂与对比试剂定性检测 ROS1 基因的阳性符合率为 100% (95%CI: 81.47%~100%)，阴性符合率为 100% (95%CI: 99.71%~100%)，总符合率为 100% (95%CI: 99.71%~100%)。进行 Kappa 一致性检验，Kappa 值为 $1 > 0.75$ ，显示二者具有很好的检测一致性。

(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，申请人在福建医科大学附属协和医院、福建省肿瘤医院、沧州市人民医院共 3 家临床试验机构进行了靶向药物疗效相关的回顾性临床研究，共入组有效病例 74 例。其中，吉非替尼片 37 例、盐酸埃克替尼片 16 例、克唑替尼胶囊 19 例、盐酸厄洛替尼片 2 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 37 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，14 例评估疾病稳定，1 例评估为疾病进展，临床用药客观缓解率为 59.46%（95%CI: 42.10% ~ 75.25%）、疾病控制率为 97.30%（95%CI: 85.84% ~ 99.93%），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 16 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，8 例临床评估部分缓解，6 例评估疾病稳定，2 例临床评估为疾病进展，临床用药客观缓解率为 50%（95%CI: 24.65% ~ 75.35%）、疾病控制率为 87.50%（95%CI: 61.65% ~ 98.45%），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 14 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 14 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，9 例临床评估部分缓解，2 例评估疾病稳定，3 例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为 64.29%（95%CI：35.14%~87.24%）、疾病控制率为 78.57%（95%CI：49.20%~95.34%），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。

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/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因突变联合检测试剂盒（半导

体测序法)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)组织样本中EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因突变。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、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，请使用本试剂盒推荐使用的配套试剂盒及软件进行检测。

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）的组织样本中 EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因变异。其中，EGFR 基因中：19 号外显子缺失、L858R 点突变用于吉非替尼片、盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测；ALK 融合基因用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测，其它突变本产品检测试剂可以检出，但

EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 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：201700111）。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（吉非替尼片、盐酸埃克替尼、克唑替尼胶囊）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。

2020 年 1 月 13 日

附件：产品说明书

人 EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因突变检测试剂盒（半导体测序法）说明书

【产品名称】

通用名称：人 EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因突变检测试剂盒（半导体测序法）

【包装规格】

16 测试/盒、32 测试/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）组织样本中 EGFR/KRAS/BRAF/HER2/ALK/ROS1 基因突变（附表 1）。其中，EGFR 基因 19 外显子缺失及 L858R 点突变用于吉非替尼片、盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测；ALK 基因融合用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测（表 1）；其余 19 个突变位点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）。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。

表 1 伴随诊断用途的基因突变类型及相应的靶向药物

靶向药物	基因及突变类型
吉非替尼片	EGFR: 19 外显子缺失、L858R
盐酸埃克替尼片	EGFR: 19 外显子缺失、L858R
克唑替尼胶囊	ALK 融合

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	G719A、G719S、G719C、T790M、 V769_D770insASV、H773_V774insH、 D770_N771insG
KRAS	G12C、G12S、G12R、G12V、G12D、G12A、G13D
BRAF	V600E
HER2	A775_G776insYVMA
ROS1	CD74-ROS1.C6:R34、EZR-ROS1.E10:R34、 SLC34A2-ROS1.S4:R32

肺癌是我国 30 年来发生率增长最快的恶性肿瘤。从病理和治疗角度，肺癌大致可以分为非小细胞肺癌和小细胞肺癌，其中非小细胞肺癌约占 80%~85%。近年来，随着研究的不断深入，非小细胞肺癌的治疗取得了很大的成功，尤其是在靶向治疗方面。

EGFR-TKI 如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼等；ALK 抑制剂/ROS1 抑制剂克唑替尼；BRAF 抑制剂达拉菲尼等靶向药物相继上市。随着基因测序技术的不断发展，非小细胞肺癌相关的致癌因子不断被证实和研究。

EGFR 基因突变是非小细胞肺癌主要的驱动基因突变。EGFR 基因的常见突变为 19 外显子缺失和 L858R，对第一代 EGFR-TKI（吉非替尼、厄洛替尼和埃克替尼）敏感；存在 G719X 的患者阿法替尼获益较好；20 号外显子插入突变为 EGFR-TKI 的耐药突变；T790M 突变为第一/二代 EGFR-TKI 的耐药突变，但对第三代 EGFR-TKI 奥希替尼敏感。

KRAS 基因是 EGFR 信号通路中一个关键的下游信号分子，在肺腺癌中 KRAS 突变比例约为 8.3%。携带 KRAS 突变的非小细

肺癌患者可能对 EGFR-TKI 原发性耐药。靶向抑制剂的缺乏使得携带 KRAS 突变的非小细胞肺癌患者无论是在治疗还是预后都十分困难。

BRAF 基因作为 MAPK/ERK 信号通路中的重要成员，影响细胞分裂、分化和分泌。该基因主要突变类型为 V600E 突变，在非小细胞肺癌中的突变率约为 3%，达拉菲尼和曲美替尼联合治疗被批准用于 V600E 突变阳性的非小细胞肺癌患者。

2%-3% 的非小细胞肺癌会发生 HER2 基因突变，其中以 20 外显子插入突变 (A775_G776insYVMA) 最常见，被认为是一种致癌驱动改变。目前有在开展阿法替尼单药治疗 HER2 插入突变非小细胞肺癌的 II 期临床试验。

在非小细胞肺癌中 ALK 基因融合阳性率约为 3%~5%；ROS1 基因融合阳性率约为 2%。克唑替尼已经被批准用于 ALK/ROS1 基因融合阳性的非小细胞肺癌患者。

【检验原理】

本试剂盒基于普通 PCR 平台结合了特异修饰引物和 RingCap® 环介连接扩增技术，以非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者经福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 组织样本提取的 DNA 和 RNA 为模板，采用特异修饰引物对靶序列进行精准 PCR 扩增，扩增产物经磁珠纯化富集后利用 RingCap® 环介连接扩增技术对扩增产物进行末端修饰、连接特异性序列端、二轮 PCR 富集扩增，最后经磁珠纯化得到测序文库。测序文库通过基因测序仪 DA8600 上机检测得到测序数据，经配套的 Torrent Suite 数据分析软件分析得到基因变异信息。在普通 PCR 平台上实现对样品核酸中目标序列进行用于高通量测序使用的文库构建，以实现多基因多靶点突变进行准确检测。

【主要组成成分】

表 3 试剂盒组成

管号	组分名称	主要内容物	颜色	16测试/盒			32测试/盒			备注
				体积	数量	八联管反应条	体积	数量	八联管反应条	
1	Onco-DNA富集 PCR反应条	引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	蓝色	20 μL	16管	2条	20 μL	32管	4条	每管反应液相同
2	Onco-RNA富集 PCR反应条	引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	粉色	20 μL	16管	2条	20 μL	32管	4条	每管反应液相同
3	Barcode 1-8 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	紫色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
4	Barcode 9-16 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	绿色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
5	Barcode 17-24 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	白色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
6	Barcode 25-32 连接反应条	不对称连接探针、通用引物、dNTPS、镁离子、PCR缓冲液	黄色	20 μL	8管	1条	20 μL	16管	2条	每管代表一个Barcode号
7	RingCap-Taq 酶 (1#)	Taq酶	—	20 μL	1管	—	40 μL	1管	—	—
8	Onco DNA阴性对照	野生型细胞系DNA	—	20 μL	1管	—	20 μL	1管	—	—
9	Onco RNA阴性对照	野生型细胞系cDNA	—	20 μL	1管	—	20 μL	1管	—	—
10	Onco DNA阳性对照	突变细胞系DNA	—	20 μL	1管	—	20 μL	1管	—	—

11	Onco RNA阳性对照	突变细胞系cDNA	—	20 μL	1管	—	20 μL	1管	—	—
----	---------------------	-----------	---	-------	----	---	-------	----	---	---

注：Barcode 连接反应体系中，不同序号分别包含有 32 个不同的 IonDx 识别序列，具体序列信息见附表 2。

注：不同批号试剂盒中各组分不可混用。

本试剂盒不包含，但推荐配套使用的试剂和软件如下：

1. 核酸提取试剂盒：建议选用厦门飞朔生物技术有限公司的核酸提取试剂（型号：FFPE DNA（离心柱法），闽厦械备20170108号）；厦门飞朔生物技术有限公司的核酸提取试剂（型号：FFPE RNA（离心柱法），闽厦械备20170109号）；
2. RNA逆转录试剂盒：选用ThermoFisher公司SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit，货号11754-050；
3. 核酸定量试剂盒：建议选用Promega公司QuantiFluor® dsDNA System，货号E2670；
4. 荧光计：建议选用Promega公司Quantus™ Fluorometer，货号E6150；
5. 核酸纯化试剂盒（磁珠法）：选用Beckman Coulter公司Agencourt AMPure XP Kit，货号A63880/A63881/A63882；
6. 测序试剂：基因测序仪DA8600配套测序试剂广州市达瑞生物技术股份有限公司测序反应通用试剂盒（半导体法），货号DR-CX-A001；
7. 数据分析：基因测序仪DA8600配套分析软件Torrent Suite Software（版本号：5.4.0）；
8. 无DNase和RNase的带滤芯移液器枪尖；
9. TE（pH8.0）缓冲液；
10. 无DNase和RNase的纯化水；
11. 无水乙醇（分析纯）；

【储存条件及有效期】

1. 储存条件：试剂盒-20±5℃避光保存，有效期9个月。开瓶后-20±5℃保存不影响产品效期。试剂盒反复冻融次数不超过5次。
2. 运输条件：本试剂盒采用泡沫箱加冰袋低温运输，运输时间不超过一周，运输温度不超过25℃。
3. 生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

1. 文库制备适用PCR仪：ABI9700、ABI2720、ABI Veriti；
2. 测序适用仪器：基因测序仪DA8600。

【样本要求】

待检测的DNA/RNA质量至关重要。临床操作中，请依据下列推荐样品类型收集样品，再进行DNA/RNA提取：

1. 推荐样品类型：石蜡包埋病理组织；
2. 石蜡包埋病理组织：从病变组织中取样应确定至少含有30%肿瘤病变组织，石蜡包埋病理组织或切片样品应确定含有肿瘤病变细胞，建议选择储存时限未超过3年的样品，使用不少于8片的5 μm切片或不少于5片的10 μm切片进行DNA或RNA提取；
3. 推荐使用商业化的试剂盒进行DNA及RNA提取，并使用紫外分光光度计判断提取的DNA的质量，其OD₂₆₀/OD₂₈₀应在1.8~2.0范围内；使用荧光计测定有效DNA浓度，DNA浓度应>2 ng/μL，DNA总量应>20 ng；若DNA浓度或质量不符合要求，应

重新取样或扩大样本量再进行DNA提取；提取完的DNA建议立即进行文库构建，或储存于-20℃以下，提取完的RNA应立即逆转录为cDNA后进行文库构建，或将cDNA储存于-20℃以下，储存时间不超过12个月。

【检验方法】

注：建议同时进行待测样本、Onco 阳性对照及 Onco 阴性对照的文库构建。

一、文库富集反应

1. 富集PCR反应试剂的准备：自冰箱中取出“Onco-DNA富集PCR反应条（蓝色）”、“Onco-RNA富集PCR反应条（粉色）”及“RingCap-Taq酶（1#）”，PCR反应管室温静置解冻，待解冻完全后快速离心待用，“RingCap-Taq酶（1#）”快速离心后置置于冰盒上待用；
2. 待测样本准备：待测样本DNA：根据荧光计测得的有效DNA浓度，将样本DNA稀释至2 ng/μL，体积≥10 μL，即为待测样本DNA；待测样本RNA：样本RNA经逆转录反应后的cDNA；
3. Onco-DNA富集反应：
 - 1) 向体积为5 μL的待测样本DNA/Onco DNA阳性对照/Onco DNA阴性对照中分别加入0.25 μL“RingCap-Taq酶（1#）”，涡旋混匀后快速离心；
 - 2) 轻轻揭开Onco-DNA富集PCR反应条管盖，取5 μL上述扩增模板，沿PCR管上管壁依序加入DNA富集PCR反应条管中，小心盖上管盖；
 - 3) 离心PCR反应条，注意避免气泡；
4. Onco-RNA富集反应：
 - 1) 向体积为5 μL的待测样本RNA/Onco RNA阳性对照/Onco RNA阴性对照中分别加入0.25 μL“RingCap-Taq酶（1#）”，涡旋混匀后快速离心；
 - 2) 轻轻揭开Onco-RNA富集PCR反应条管盖，取5 μL上述扩增模板，沿PCR管上管壁依序加入RNA富集PCR反应条管中，小心盖上管盖；
 - 3) 离心PCR反应条，注意避免气泡；
5. 将上述DNA富集PCR反应条及RNA富集PCR反应条放入PCR仪反应槽，注意去掉PCR仪的反应辅助板；
6. 打开PCR仪设置界面，按照表4设置扩增程序，执行PCR扩增。

表4 文库富集反应 PCR 扩增程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	98℃	2分钟	1个
变性	98℃	15秒	12个
退火	68℃	4分钟	
保存	10℃	2分钟	1个

注：若不立即进行后续操作，应低温储存反应产物；4h内储存于2~8℃；24h内储存于-20±5℃；建议储存时间不超过24h。

二、富集产物纯化

注：取出 Agencourt AMPureXP 试剂置于室温，充分涡旋以重悬磁珠；配制新鲜的 70%乙醇溶液。

1. 将25 μL PCR反应产物完全转移至新的1.5 mL离心管中，加入37.5 μL（1.5x样本体积）Agencourt AMPure XP试剂，上下吸取吹打液体5次以完全混匀重悬DNA与磁珠；

2. 室温静置孵育5分钟；
3. 放置磁力架上孵育2分钟，直至溶液澄清，小心吸取并弃去上清，切勿扰动磁珠；**注意：磁珠上含有扩增文库，请勿丢弃；**
4. 加入150 μL 新鲜配制的70%乙醇溶液（乙醇溶液没过磁珠样品即可），置于磁力架上，顺时针/逆时针方向转动离心管5次放置磁力架上孵育2分钟，直至溶液澄清，弃去上清；
5. 重复上述步骤4，进行第二次洗涤；
6. 确保离心管中的乙醇溶液已完全弃去，将离心管置于磁力架上，室温空气干燥5分钟，注意避免过度干燥；
7. 将离心管自磁力架上取下，加入40 μL TE (pH8.0) 缓冲液充分浸润磁珠，充分振荡混匀后快速离心将液体收集至管底（或使用移液器吸取一半以上的液体，多次上下吹打液体以充分混匀），室温静置孵育5分钟；
8. 将离心管置于磁力架上2分钟，直至溶液澄清，吸取上清液，即为扩增纯化产物，合理储存或立即进行下一步反应。

三、文库制备反应

注：使用不同序号的 Barcode 反应管进行样本 DNA 突变及 RNA 融合突变的文库制备。

1. Barcode连接反应的准备：根据样本DNA及RNA总数，自冰箱中取出相应数量的Barcode连接反应条及“RingCap-Taq酶(1#)”，反应条室温静置解冻，待解冻完全后快速离心待用，“RingCap-Taq酶(1#)”快速离心后置于冰盒上待用；
2. Onco-DNA文库制备：
 - 1) 取 5 μL 上述待测样本 DNA/Onco DNA 阳性对照/Onco DNA 阴性对照反应管的扩增纯化产物，加入 0.25 μL “RingCap-Taq 酶(1#)”，涡旋混匀后快速离心；
 - 2) 轻轻揭开 Barcode 连接反应条管盖，取 5 μL 上述扩增模板，沿 PCR 管上管壁依序加入相应序号的 Barcode 连接反应条管中，小心盖上管盖；
 - 3) 离心 Barcode 连接反应条，注意避免气泡；
3. Onco-RNA文库制备：
 - 1) 取 5 μL 上述待测样本 RNA/Onco RNA 阳性对照/Onco RNA 阴性对照反应管的扩增纯化产物，加入 0.25 μL “RingCap-Taq 酶(1#)”，涡旋混匀后快速离心；
 - 2) 轻轻揭开 Barcode 连接反应条管盖，取 5 μL 上述扩增模板，沿 PCR 管上管壁依序加入相应序号的 Barcode 连接反应条管中，小心盖上管盖；
 - 3) 离心 Barcode 连接反应条，注意避免气泡；
4. 将上述Barcode连接反应条放入PCR仪反应槽，注意去掉PCR仪的反应辅助板；
5. 打开PCR仪设置界面，按照表5设置扩增程序，执行PCR扩增。

表 5 文库制备反应 PCR 扩增程序

阶段	温度	时间	循环数
预变性	98 $^{\circ}\text{C}$	2 分钟	1 个
变性	98 $^{\circ}\text{C}$	15 秒	25 个
退火	68 $^{\circ}\text{C}$	4 分钟	
保存	10 $^{\circ}\text{C}$	2 分钟	1 个

注：若不立即进行后续操作，应低温储存反应产物；4h内储存于2-8 $^{\circ}\text{C}$ ；24h内储存于-20 \pm 5 $^{\circ}\text{C}$ ；建议储存时间不超过24h。

四、文库产物纯化

注：取出 Agencourt AMPure XP 试剂置于室温，充分涡旋以重悬磁珠；配制新鲜的 70%乙醇溶液。

1. 将25 μL PCR反应产物完全转移至新的1.5 mL离心管中，加入37.5 μL (1.5 x样本体积) Agencourt AMPure XP试剂，上下吸取吹打液体5次以完全混匀重悬DNA与磁珠；
2. 室温静置孵育5分钟；
3. 放置磁力架上孵育2分钟，直至溶液澄清，小心吸取并弃去上清，切勿扰动磁珠；注意：磁珠上含有扩增文库，请勿丢弃；
4. 加入150 μL 新鲜配制的70%乙醇溶液（乙醇溶液没过磁珠样品即可），置于磁力架上，顺时针/逆时针方向转动离心管5次，放置磁力架上孵育2分钟，直至溶液澄清，弃去上清；
5. 重复上述步骤4，进行第二次洗涤；
6. 确保离心管中的乙醇溶液已完全弃去，将离心管置于磁力架上，室温空气干燥5分钟，注意避免过度干燥；
7. 将离心管自磁力架上取下，加入40 μL TE (pH8.0) 缓冲液充分浸润磁珠，充分振荡混匀后快速离心将液体收集至管底（或使用移液器吸取一半以上的液体，多次上下吹打液体以充分混匀），室温静置孵育5分钟；
8. 将离心管置于磁力架上静置2分钟，直至溶液澄清，吸取上清液，即为文库，合理储存或进行后续操作。

五、文库定量、稀释及储存

1. 文库质检：使用毛细管电泳仪进行文库片段质检，文库主要片段应分布于200~300 bp左右；使用核酸定量试剂盒进行文库浓度测定，荧光计文库浓度测定结果 $<34 \text{ ng/mL}$ 判定为文库不合格；
2. 根据荧光计测得文库浓度，使用无DNase和RNase的纯化水将文库稀释至 34 ng/mL ；
3. 将浓度均为 34 ng/mL 的DNA文库及RNA文库按4:1的比例混匀（如：每个DNA文库取8 μL 与每个RNA文库取2 μL 混匀），快速离心待用；
4. 未经稀释的文库可于 $-20\pm 5^\circ\text{C}$ 储存7天；混匀的稀释文库建议现配现用。

六、文库富集、测序

1. 取上述混匀的文库在Ion One touch 2仪器上进行油包水PCR反应，选择Proton: Ion PI™ Hi-Q™ OT2 200 Kit运行程序，按照配套测序试剂测序反应通用试剂盒（半导体法）的说明书进行操作；整个程序运行时间大约5小时，运行结束后产物可于常温放置8小时，可运行过夜；
2. 油包水PCR反应得到的产物可以转移至Ion One touch ES仪器上进行纯化，按照配套测序试剂测序反应通用试剂盒（半导体法）的说明书进行操作；仪器自动完成纯化操作，运行时间大约40 min；
3. 参照基因测序仪使用说明书的操作，完成基因测序仪的清洗和初始化；
4. 登录基因测序仪服务器，单击“Plan”选项卡，选择“Templates”模块，查找对应的模板程序（初次使用时，可在技术支持帮助下创建模板程序并保存），下拉菜单中选择“Plan Run”运行实验程序；
5. 在“Run Plan Name”文本框中对本次实验进行命名，输入样本数量、信息及对应的Barcode编号，点击“Plan Run”；
6. Ion One touch ES仪器运行结束时，纯化后的产物被自动转移至0.2 mL的EP管中，参照基因测序仪使用说明书的操作，完成芯片校准和加载，并加入测序聚合酶，室温孵育5 min；
7. 将加载有文库模板的芯片转移至芯片夹中固定，关闭芯片室，开始运行步骤5设定好的实验程序，开始测序；

8. 测序结束后，进行水洗并关闭仪器。

七、生物信息分析

1. 测序完成后，测序数据传输到服务器，通过DA8600基因测序仪自带的Torrent Suite(版本号5.4.0)分析软件中“Alignment”、“Variant Caller”及“Coverage Analysis”等程序进行碱基识别、序列比对和变异分析。
2. 服务器首先进行碱基识别分析，将测序数据中的电信号文件转换成储存未比对序列的uBAM文件。
3. 将uBAM文件比对到人类参考基因组(hg19版本)，并对插入缺失区域进行重新排列，得到经过重排校正的BAM文件。
4. 对位于检测范围内的区域进行变异识别并生成用于储存变异位点的VCF文件和等位基因变异的EXCEL文件。
5. 分析结束后，服务器将在“Data”选项卡中生成本次实验的“Completed Runs & Reports”信息，可以查看到芯片的整体上机质量、样本的质控数据；同时针对每个样本生成比对后的原始数据bam, bai文件，以及标注有COSMIC ID等突变信息的原始结果。
6. 利用IGV软件手动查看原始数据bam, bai文件，对检测结果进行验证确认。

【阳性判断值】

1. 通过Ion torrent高通量测序仪自带Torrent Server服务器中分析软件“Alignment”、“Variant Caller”及“Coverage Analysis”，将样本测序所得数据与“hg19”及本试剂盒提供的“OncoDNA_target.region.bed”、“OncoDNA_hotspot.bed”及“OncoRNA_sequence.fasta”、“OncoRNA_target.bed”插件文档进行比对所得结果数据。
2. 结果判定：
 - 2.1 Onco-DNA结果判定：Variant Caller分析结果下，对每个样本Barcode数据表中筛选“Allele Call为Heterozygous”且“Allele Source为Hotspot”，从而得到“Allele Name”中样本的突变COSMIC ID信息：
 - 1) 存在COSMIC ID，即为样本的突变阳性COSMIC ID；
 - 2) 不存在COSMIC ID，则样本为突变阴性，或低于检测下限。
 - 2.2 Onco-RNA结果判定：
 - 1) 本试剂盒内设有5个内控基因，RNA融合基因突变分析“Coverage Analysis”结果中，5个内控基因至少有2个基因的比对序列数据记录的读数(Total reads) ≥ 200 ；
 - 2) 本试剂盒提供融合突变的判读方式为“特定融合位点检测”，从融合转录分析得出的序列数据记录的格式为每个靶点有几个读数，不同于其他分析平台，在解读结果时应考虑背景信号水平：
 - a) 若样本正反向没有被读通，记录特定融合位点为阴性；
 - b) 若样本正反向均有读通，且Total reads < 200 ，表示检测到接近于背景信号的融合，需提高文库的上样量，重新检测后Total reads < 200 ，记录特定融合位点为阴性或低于检测下限；
 - c) 若样本正反向均有读通，且Total reads ≥ 200 ，记录特定融合位点为阳性。

【检验结果的解释】

1. 文库通过毛细管电泳试验后应在200~300 bp左右有较强条带，否则本次实验无效；
2. Onco DNA阴性对照和Onco DNA阳性对照通过高通量测序检测，文库质量要求均一性应 $\geq 75\%$ ，测序深度应 ≥ 1000 层；Onco

DNA阴性对照检测结果应为阴性；Onco DNA阳性对照检测结果应为相应突变类型阳性；

3. Onco RNA阴性对照和Onco RNA阳性对照通过高通量测序检测，文库质量要求5个内控基因至少有2个基因的比对序列数据记录的读数 ≥ 200 ；Onco RNA阴性对照检测结果应为阴性；Onco RNA阳性对照检测结果应为相应突变类型阳性；
4. 待测样品DNA文库通过毛细管电泳试验后应于200~300 bp左右有较强条带，通过高通量测序，均一性应 $\geq 75\%$ ，测序深度应 ≥ 1000 层，否则待测样本DNA的检测结果无效；
5. 待测样品RNA融合基因突变分析“Coverage Analysis”结果中，若5个内控基因少于2个基因的比对序列数据记录的读数 ≥ 200 ，则本次RNA融合基因检测结果无效。

【检验方法的局限性】

本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊治的唯一依据。对于超出本试剂盒检测位点范围及对保存年限超出时限的石蜡组织样品所提取的DNA/RNA的检测能力不能按照本说明书进行。

【产品性能指标】

1. 试剂盒应外观整洁、标记清晰、无漏液；试剂融化后应澄清、无混浊、无沉淀。
2. 检测31份企业阳性参考品、19份国家阳性参考品，阳性参考品符合率均为100%。
3. 检测8份企业阴性参考品、11份国家阴性参考品，阴性参考品符合率均为100%。
4. 可检出2 ng/ μL DNA样品中含量低至5%的基因突变；可检出RNA样品中含量低至20拷贝/ μL 的融合突变。
5. 检测3份企业重复性参考品，每个样本重复检测10次，检测结果均为相应突变类型阳性。
6. 检测18例检测范围外的国家阳性参考品、2例检测范围外的RNA融合阳性临床样本以及4份微生物基因组DNA，检测结果均为阴性，表明检测范围外的阳性突变和肺部常见微生物均不会对产品的检测结果产生影响。
7. 样本核酸中残留的血红蛋白、石蜡、福尔马林、乙醇浓度不高于2 g/L、1% V/V、0.005% V/V、1% V/V的情况下不会对产品的检测结果产生影响。
8. 临床试验结果：

(1) 临床试验在3家临床机构共同开展，共计完成1267例非小细胞肺癌样本（包括腺癌、鳞癌和腺鳞癌等），样本类型为石蜡包埋组织。选择已上市伴随诊断试剂作为对比方法，分别考察EGFR、KRAS、BRAF、HER2、ALK、ROS1基因的多种变异类型，对于考核试剂与对比试剂检测结果不一致的样本或不在对比试剂检测范围内的位点，采用Sanger测序方法进行序列测定。本试剂盒共检测出748例基因变异阳性样本，与对比试剂相比，考核试剂检测位点在对比试剂检测范围内两者定性检测结果阳性符合率为99.85%，阴性符合率100%，总符合率99.92%。经Kappa一致性检验，Kappa值=0.9983，说明两者检测具有高度一致性；考核试剂检测位点不在对比试剂检测范围内的采用Sanger测序方法进行序列测定，两者定性检测结果总符合率100%。

(2) 与已上市伴随诊断试剂进行比较研究，考核试剂检测EGFR、ALK与对比试剂相比，所有基因的定性检测结果详见表6，结果显示考核试剂与对比试剂具有较好的检测一致性。

表6 伴随诊断试剂对比研究结果

癌症类型	基因类别	阳性符合率	阴性符合率	总符合率	Kappa值
非小细胞肺癌	EGFR	99.81%	98.77%	99.21%	0.9838
非小细胞肺癌	ALK	100%	99.54%	99.63%	0.9887

(3) 回顾性靶向药物研究共计74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37例，盐酸埃克替尼片（凯美纳）16例，克唑替尼胶囊（赛可瑞）14例。本试剂盒检测结果与回顾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。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 遵循实验室管理规范以尽可能减少产品及试剂交叉污染；如有条件，应对配制PCR反应的区域或房间及后续的操作区域进行分区规划。
3. 实验开始之前，应使用10%次氯酸清洗实验台面，再用水清洗两次；实验完毕后，使用10%次氯酸或75%酒精或紫外线灯处理工作台及移液器。
4. 尽量避免使用PCR仪的外围反应孔，样品孔之间尽量预留孔或列以避免样本之间交叉污染。
5. 本试剂盒结果可受到样品来源、样品采集过程、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DNA提取质量、高通量测序仪型号、操作环境以及当前分子生物学技术局限性等限制，可能导致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错误、准确性的局限性。
6. 避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂，冻融次数不超过5次。
7. 检测所用DNA/RNA的质量至关重要，DNA提取后建议进行磁珠纯化，以保证DNA纯度，同时应进行质控以确定提取质量，提取完成后应尽快进行下一步骤或按推荐温度合理储存，RNA样本建议进行逆转录为cDNA后保存。
8. 本试剂盒所有试剂均经过特殊配制，随意替换其中任何试剂均可能影响使用效果，不同批号试剂盒成分不可相互混用。
9. 严格注意操作，建议使用带滤芯的移液器吸头以防止试剂污染，造成假阳性结果。
10. 注意防止外源核酸对试剂的污染。建议在制备反应试剂及添加DNA模板时，使用单独、专用的移液器及滤芯吸头。制备反应试剂的地点应与添加模板的地点相隔离。
11. 所有化学药品均有潜在危险性。持有PCR实验室上岗证的人员方可使用本试剂盒。首次使用本试剂盒前，公司技术支持人员可对操作者进行培训。操作时，请穿着合适的实验室工作服、佩戴手套等防护性措施。
12. 所有检测样本及试剂盒中的阳性对照应视为有感染性物质，应小心操作，使用过的试剂盒为临床废弃物，应妥善处理。
13. 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。

【标识的解释】



: 参考使用说明书;



: 体外诊断器械;



: 向上;



: 保持干燥;



: 避免日晒。

【参考文献】

1. De Roock W, Claes B, Bernasconi D, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. *Lancet Oncol.* 2010, 11 (8): 753-62.
2. Soda M, Choi YL, Enomoto M, et al. Identification of the transforming EML4-ALK fusion gene in non-small-cell lung cancer. *Nature.* 2007, 448 (7153): 561-6.
3. Ou SH, Tan J, Yen Y, et al. ROS1 as a 'druggable' receptor tyrosine kinase: lessons learned from inhibiting the ALK pathway. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2012, 12 (4): 447-56.
4. Turke AB, Zejnullahu K, Wu YL, et al. Preexistence and clonal selection of MET amplification in EGFR mutant NSCLC. *Cancer Cell.* 2010, 17 (1): 77-88.
5. Mork TS, Wu YL, Thongprasert S, et al. Gefitinib or carboplatin-paclitaxel in pulmonary adenocarcinoma. *N Engl J Med.* 2009, 361 (10): 947-57.
6. Gazdar AF. Personalized medicine and inhibition of EGFR signaling in lung cancer. *N Engl J Med.* 2009, 361 (10): 1018-20.
7. Dancey JE. Epidermal growth factor receptor inhibitors in non-small cell lung cancer. *Drugs.* 2007, 67 (8): 1125-38.
8. Jemal A, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2011, 61 (2): 69-90.
9. Soulières D, Greer W, Magliocco AM, et al. KRAS mutation testing in the treatment of metastatic colorectal cancer with anti-EGFR therapies. *Curr Oncol.* 2010, 17 Suppl 1: S31-40.
10. Chapman PB, Hauschild A, Robert C, et al. Improved survival with vemurafenib melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med.* 2011, 364 (26): 2507-16.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 厦门飞翔生物技术有限公司

住所: 厦门市同安区西柯镇西洲路2041号四层401单元

电话: 传真:

网址: E-mail:

售后服务单位名称: 厦门飞翔生物技术有限公司

电话:

生产地址: 厦门市同安区西柯镇西洲路2041号四层401单元

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】

附表:

附表 1 本试剂盒检测基因变异具体信息

基因名称	突变信息				COSMI C ID	突变类型
	外显子	扩增区域	碱基突变形式	氨基酸突变形式		
EGFR	Exon18	chr7:55241643~55241730	c.2156G>C	p.G719A	6239	点突变
			c.2155G>A	p.G719S	6252	点突变
			c.2155G>T	p.G719C	6253	点突变
	exon19	chr7:55242419~55242510	c.2235_2249del15	p.E746_A750del	6223	缺失突变
			c.2236_2250del15	p.E746_A750del	6225	缺失突变
			c.2240_2257del18	p.L747_P753>S	12370	缺失突变
			c.2239_2248>C	p.L747_A750>P	12382	缺失突变
			c.2237_2255>T	p.E746_S752>V	12384	缺失突变
			c.2239_2251>C	p.L747_T751>P	12383	缺失突变
			c.2237_2251del15	p.E746_T751>A	12678	缺失突变
	exon20	chr7:55248995~55249097	c.2369C>T	p.T790M	6240	点突变
			c.2307_2308insGCC AGCGTG	p.V769_D770insASV	12376	插入突变
			c.2319_2320insCAC	p.H773_V774insH	12377	插入突变
			c.2310_2311insGGT	p.D770_N771insG	12378	插入突变
	exon21	chr7:55259484~55259578	c.2573T>G	p.L858R	6224	点突变
	KRAS	exon2	chr12:25398233~25398308	c.34G>T	p.G12C	516
c.34G>A				p.G12S	517	点突变
c.34G>C				p.G12R	518	点突变
c.35G>T				p.G12V	520	点突变
c.35G>A				p.G12D	521	点突变
c.35G>C				p.G12A	522	点突变
c.38G>A				p.G13D	532	点突变
BRAF	exon15	chr7:140453075~140453155	c.1799T>A	p.V600E	476	点突变
HER2	exon20	chr17:37880965~37881063	c.2324_2325ins12	p.A775_G776insYVMA	20959	插入突变
ALK	EML4-ALK.E13:A20.				463	融合突变
	EML4-ALK.E6ins33:A20.				474	融合突变
	EML4-ALK.E20:A20.				465	融合突变
	EML4-ALK.E18:A20.				1376	融合突变
ROS1	CD74-ROS1.C6:R34.				1201	融合突变
	EZR-ROS1.E10:R34.				1268	融合突变
	SLC34A2-ROS1.S4:R32.				1197	融合突变

附表2 Ion torrent 平台 32 个不同的 IonDx 识别序列信息

八联管颜色	Barcode 编号	序列	八联管颜色	Barcode 编号	序列
紫色	IonDx_001	CTAAGGTAAC	白色	IonDx_017	TAAGGAGAAC
	IonDx_002	TTACAACCTC		IonDx_018	AAGAGGATTC
	IonDx_003	CCTGCCATTCGC		IonDx_019	TACCAAGATC
	IonDx_004	TGGAGGACGGAC		IonDx_020	CAGAAGGAAC
	IonDx_005	TGAGCGGAAC		IonDx_021	CTGCAAGTTC
	IonDx_006	CCTTAGAGTTC		IonDx_022	TTCGTGATTC
	IonDx_007	TCCTCGAATC		IonDx_023	TTCCGATAAC
	IonDx_008	AACCTCATTC		IonDx_024	CTGACCGAAC
绿色	IonDx_009	CGGACAATGGC	黄色	IonDx_025	TCTAACGGAC
	IonDx_010	TCCTGAATCTC		IonDx_026	TTGGAGTGTC
	IonDx_011	TAAGCCATTGTC		IonDx_027	TCTAGAGGTC
	IonDx_012	CTGAGTTCGGAC		IonDx_028	TCTGGATGAC
	IonDx_013	CGGAAGAACCTC		IonDx_029	TCTATTCGTC
	IonDx_014	TCTTACACAC		IonDx_030	AGGCAATTGC
	IonDx_015	AAGGAATCGTC		IonDx_031	TTAGTCGGAC
	IonDx_016	TAGGTGGTTC		IonDx_032	CAGATCCATC

附表3 本试剂盒基因检测范围及扩增子区域

基因名	基因类型	覆盖外显子	扩增区域/COSF号
NRAS	DNA	2	chr1: 115258705-115258791
		3	chr1: 115256465-115256550
PIK3CA		10	chr3: 178936022-178936106
		14	chr3: 178938806-178938886
		21	chr3: 178952014-178952096
PDGFRA		12	chr4:55141002-55141094
		18	chr4:55152012-55152106
KIT		9	chr4: 55592157-55592246
		11	chr4: 55593598-55593692
		13	chr4: 55594210-55594301
		17	chr4: 55599293-55599382
EGFR		18	chr7: 55241643-55241730
		19	chr7: 55242419-55242510
		20	chr7: 55248995-55249097
		21	chr7: 55259484-55259578
		2	chr7: 116339602-116339691
MET		2	chr7: 116340195-116340289
		14	chr7: 116411917-116412003
		16	chr7: 116417452-116417540
		19	chr7: 116423397-116423488
BRAF		15	chr7: 140453075-140453155
KRAS	2	chr12: 25398233- 25398308	
	3	chr12: 25380263-25380351	
	4	chr12: 25378526-25378610	
AKT1		2	chr14: 105246496-105246583
HER2	19	chr17: 37880183-37880280	
	20	chr17: 37880965-37881063	
	21	chr17: 37881291-37881385	
ALK	RNA	EML4-ALK.E13A20.	COSF463
		EML4-ALK.E6A20.	COSF474
		EML4-ALK.E6A20.	COSF734
		EML4-ALK.E20A20.	COSF465
		EML4-ALK.E18A20.	COSF1376
		EML4-ALK.E13A20.	COSF1063
		EML4-ALK.E20A20.	COSF731
		EML4-ALK.E2A20.	COSF480
		EML4-ALK.E2A20.	COSF1543
		EML4-ALK.E14A20.	COSF491
		EML4-ALK.E17A20.	COSF1366
		EML4-ALK.E17A20.	COSF1367
		EML4-ALK.E17A20.	COSF733
		EML4-ALK.E14A20.	COSF1064
		EML4-ALK.E14A20.	COSF1065
		EML4-ALK.E6A19.	COSF1297
		EML4-ALK.E15A20.	COSF475
EML4-ALK.E15A20.	COSF413		
EML4-ALK.E6A20.	COSF1545		
EML4-ALK.E14A20.	COSF1542		
EML4-ALK.E13A20.	COSF1540		
ROS1	CD74-ROS1.C6R34.	COSF1201	
	GOPC-ROS1.G4R36.	COSF1295	
	GOPC-ROS1.G8R35.	COSF1251	
	CD74-ROS1.C6R32.	COSF1203	
	SDC4-ROS1.S2R32.	COSF1266	
	SDC4-ROS1.S4R32.	COSF1279	
	SLC34A2-ROS1.S13R32.	COSF1260	
	SLC34A2-ROS1.S4R32.	COSF1197	
	EZR-ROS1.E10R34.	COSF1268	
	LRIG3-ROS1.L16R35.	COSF1270	
	TPM3-ROS1.T8R35.	COSF1274	
	SLC34A2-ROS1.S4R34.	COSF1198	
	SLC34A2-ROS1.S13R34.	COSF1261	
	SDC4-ROS1.S2R34.	COSF1672	
SDC4-ROS1.S4R34.	COSF1280		

RET	CCDC6-RET.C1R12.	COSF1272
	NCOA4-RET.N8R12.	COSF1492
	KIF5B-RET.K15R12.	COSF1233
	PRKAR1A-RET.P7R12.	COSF1512
	KIF5B-RET.K16R12.	COSF1610
	KIF5B-RET.K22R12.	COSF1254
	KIF5B-RET.K23R12.	COSF1235
	KIF5B-RET.K24R11.	COSF1263
	KIF5B-RET.K15R11.	COSF1256
	KIF5B-RET.K24R8.	COSF1242
	GOLGA5-RET.G7R12.	COSF1504
	HOOK3-RET.H11R12.	COSF1510
	KTN1-RET.K29R12.	COSF1514
	PCM1-RET.P29R12.	COSF1482
	NCOA4-RET.N6R12.	COSF1341

注：在上述表中所列扩增子范围内的体细胞突变均可检出。