

受理号：JSZ2000087

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人乳腺癌分子分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

产品英文（原文）名称：Human Breast Cancer Molecular Subtyping Quantitative Detection Kit(PCR-Fluorophore-labeling Probes)

产品管理类别：第三类

申请人名称：BioNTech Diagnostics GmbH

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.....	6
三、 临床评价概述.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	16

基本信息

一、申请人名称

BioNTech Diagnostics GmbH

二、申请人住所

An der Goldgrube 12 D-55131 Mainz Germany

三、生产地址

Minerva Biolabs GmbH Schkopauer Ring 13 12681 Berlin

Deutschland

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：检测体系混合液 1、检测体系混合液 2、检测体系混合液 3、酶混合液、阳性对照、阴性对照。详见表 1：

表 1. 产品主要组成成分

管号	试剂名称	试剂组成	试剂规格	数量
A	酶混合液	逆转录酶, DNA 聚合酶, dNTPs	260 μ l	1 管
B	检测体系混合液 1	DNA 寡核苷酸, qPCR 探针	90 μ l	1 管
C	检测体系混合液 2	DNA 寡核苷酸, qPCR 探针	90 μ l	1 管
D	检测体系混合液 3	DNA 寡核苷酸, qPCR 探针	90 μ l	1 管
E	阳性对照	特异性阳性对照模板 RNA	60 μ l	1 管
F	阴性对照	无 RNA 酶的水	350 μ l	1 管

(二) 产品预期用途

用于体外半定量检测浸润性乳腺癌 FFPE 组织切片样本中基因 ERBB2 (HER2)、ESR1 (ER)、PGR (PR) 以及 MKI67 (Ki-67) 的 mRNA 表达水平。

适用于免疫组化 (IHC) 不易判定或结果不满意, 以及 IHC 结果与治疗预期有较大差别的病例, 以进一步辅助判断乳腺癌分子分型。检测结果仅供临床参考, 不能作为患者个体化治疗的唯一依据。本产品检测结果不能替代 IHC, 只能作为 IHC 的补

充。

(三) 产品包装规格

10 测试/盒

(四) 产品检验原理

通过逆转录实时定量 PCR (RT-qPCR)，利用 Taqman 技术对四个目标基因 (ERBB2、ESR1、PGR 以及 MKI67) 及两个参考基因的 mRNA 表达水平进行定量检测。

每个检测由三个反应体系组成，每个反应体系包含针对两个基因的检测试剂，即在同一个反应管中，通过不同的荧光标记探针可以同时检测两个不同的靶基因。其中一个靶基因使用 FAM 信号进行检测，而另一个使用 HEX 信号检测。使用的水解探针在 5' 端进行了荧光基团修饰，3' 端添加了淬灭基团。探针完整时，荧光基团的荧光信号被淬灭基团吸收。而当探针在 PCR 扩增过程中特异性结合到目标序列上，DNA 聚合酶的 5' 端→3' 端外切酶活性将探针酶切降解，使得荧光基团和淬灭基团分离，荧光基团发出荧光。在每轮 PCR 循环结束时测得的荧光信号值与合成的目标产物成正比。在 PCR 反应过程中，荧光信号超过背景信号所需的 PCR 反应循环数被用来测定反应开始时待检核酸的分子数。在具体表达分析中，靶基因（四个分子标志物基因）的 C_q 值和内参基因（两个 house-keeping 基因）的 C_q 值

的差值 (ΔCq) 可以作为 RNA 起始值变化的补偿值, 使所有测试可以保持同一起始值。此外, ΔCq 再减掉一个校准值, 可以修正同一个制造商的不同仪器间的运行差异以及同一仪器不同运行次数间的差异 ($\Delta\Delta Cq$)。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

试剂盒的主要原材料包括: 引物、探针、酶和 IVT-RNA, 这些原材料均为外购方式获得。引物、探针和 IVT-RNA 为申请人自行设计后由专业的合成公司合成制备。申请人选择有资质的供应商提供的原材料, 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的设置情况

企业参考品包括线性参考品、准确度参考品、特异性参考品、精密度参考品和检测限参考品。

线性参考品共 6 支, 为 IVT-RNA, 覆盖 10^4 分子/ml~ 10^8 分子/ml 浓度范围。

准确度参考品共 5 支, 为临床浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本, 覆盖 4 个目标基因的 IHC 分档范围。

特异性参考品共 23 支, 其中 2 支为去除正常组织成分和未

去除正常组织成分的另一浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本，3 支大肠杆菌 DH5 α ，3 支金黄色葡萄球菌，15 支同源序列 IVT-RNA。

精密度参考品共 2 支，为高低两个浓度的 IVT-RNA。

检测限参考品共 4 支，为检测限浓度的 IVT-RNA。

产品设置了阳性对照和阴性对照各 1 支，阳性对照为 IVT-RNA，阴性对照为无核酸酶水，检测过程中试剂和仪器的质量控制。阳性对照的浓度通过校准过的 Nanodrop ND-2000c 紫外分光光度计测量获得。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对该产品反应体系的研究包括引物探针浓度配比、酶组分浓度验证、PCR 反应程序研究、提取试剂研究、适用样本类型研究、样本有效性研究和质控品验证，确定了该产品的反应体系、反应程序、提取方法和样本要求。

申请人通过功能性试验，对生产工艺的关键工序检测体系混合液配制、阳性对照配制进行了研究，确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

分析性能评估内容主要包括：准确性、精密度、分析灵敏度、分析特异性、线性范围；核酸提取试剂的性能研究。申请人提交了每个性能三批产品（1026、1066、2066、21F1、21F2、

21F3) 在适用机型上的性能评估资料。

准确性研究使用三批试剂盒对覆盖 4 个目标基因高中低范围的 40 例浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本进行检测，检测结果显示，ERBB2 (HER2) 符合率为 97.5%、ESR1 (ER) 符合率为 100%、PGR (PR) 符合率为 97.5%、MKI67 (Ki-67) 符合率为 97.5%。

在精密度研究中，申请人选取中、低浓度的浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本，使用三批试剂盒评价了涵盖批内、批间、日内、日间、仪器间及不同操作者间的精密度，结果显示三个批次 4 个目标基因的变异系数均 < 5%。

分析灵敏度研究中，申请人使用数字 PCR 定量技术对 IVT-RNA 进行定量，按照定量浓度将 IVT-RNA 系列稀释，对每个梯度分别进行 20 次重复检测，以不低于 95% 检出率作为该试剂盒最低检出限，最低检出限为 20 拷贝/孔。

在确定本试剂盒最低检出限后，申请人使用数字 PCR 定量技术对浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本进行定量，根据定量浓度将临床样本稀释至最低检出限，重复检测 20 次，检出率 $\geq 95\%$ 。

分析特异性研究中，申请人通过 NCBI 特异性分析，确定 ERBB2 的同源性序列为 HER1、HER3、HER4、PRER，ESR1 的同源性序列为 ESR2、AR、PGR、PRR14L、RHBDL3，PGR 的同源性序列为 ESR1、ESR2，CALM2 的同源性序列为 CALM1、CALM3，B2M 的

同源性序列为 HLA-E, 申请人委托合成上述同源序列的 IVT-RNA, 使用该产品进行检测, 均无交叉。

同时申请人评估了浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本中常见的大肠杆菌和金黄色葡萄球菌, 均无交叉。

在线性范围研究中, 申请人使用数字 PCR 定量技术对 IVT-RNA 进行定量, 按照定量浓度将 IVT-RNA 系列稀释 13 个梯度, 对上述系列稀释样本进行检测, 确定该产品线性范围为 1.00×10^8 拷贝/孔~20 拷贝/孔。

在确定线性范围后, 申请人使用数字 PCR 定量技术对 3 例合适的浸润性乳腺癌 FFPE 样本进行定量, 根据定量浓度将临床样本稀释 5 个梯度, 对上述系列稀释样本进行检测, $|R| > 0.99$ 。

针对适用的核酸提取试剂, 申请人针对提取效率、抗干扰、分析灵敏度和精密度进行了验证, 确定适用的核酸提取试剂均符合检测要求。

(四) 阳性判断值或参考区间研究

该产品用于参考值确认和验证的浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本来源于临床医院, 样本经 IHC 方法验证。

共收集 274 例浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本, 使用该产品进行检测, 以 IHC 检测结果为参照, 利用 SPSS18 软件制作受试者工作特征 (ROC) 曲线图, 最终确定试剂盒检测的 ERBB2、ESR1、

PGR 和 MKI67 mRNA 的阳性判断值如表 2:

表 2. 阳性参考值

ERBB2	ESR1		PGR		MKI67	
	阴性/阳性	弱阳/中强阳	阴性/阳性	弱阳/中强阳	阴性/阳性	弱阳/中强阳
41.1	36.9	38.5	35.1	36.5	35.9	37.2

参考值验证: 申请人收集覆盖 4 个目标基因高中低范围的浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本, 使用该产品进行检测, 检测结果显示, ERBB2 (HER2) 符合率为 97.5%、ESR1 (ER) 符合率为 100%、PGR (PR) 符合率为 97.5%、MKI67 (Ki-67) 符合率为 97.5%。

综合以上研究确认阳性判断值设置能够满足临床需求。

(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、开瓶稳定性进行了研究, 确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。所用试剂批次包括: 90021-1123、90021-2123、90020-1123、21F1、21F2、21F3。

同时对浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本稳定性、核酸提取物稳定性进行了研究, 确定了检测过程中各种样本类型的有效保存时间。

实时稳定性、冻融稳定性和开瓶稳定性研究: 申请人采用

三批试剂盒（批号：90021-1123、90021-2123、90020-1123），储存于试剂盒标示储存条件下分别于 0、6、7、12、13、18、19、24、25 月取出，使用企业内部参考品进行检测，各项性能指标均符合要求。其中在 0、6、7 月时同步评估了开瓶 6 个月和冻融 3 次。确定该产品于 -15°C ~ -25°C 条件下储存效期为 24 个月，开瓶效期为 6 个月，冻融次数不超过 3 次。

运输稳定性研究：申请人于夏季将三批试剂盒（批号：21F1、21F2、21F3）采用泡沫箱加干冰的形式运输 5 天，于收到当天和储存至效期末分别进行一次检测，各项性能指标均符合要求。确定了该产品的运输条件。

申请人对浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本、核酸提取液进行了研究，研究确认浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本在 $+4^{\circ}\text{C}$ ， -20°C ， -80°C 以下可保存 11 个月；核酸提取物在 -20°C ， -80°C 以下至少可保存 10 个月。

三、临床评价概述

申请人在四川大学华西医院、复旦大学附属肿瘤医院和河北医大附属第四医院共三家临床试验机构开展临床试验。

采用试验体外诊断试剂与乳腺癌分子分型的临床参考标准 ER、PR、HER-2、Ki-67 免疫组织化学法检测结果进行比较研究，其中 HER-2 组化检测为 2+ 的样本进一步采用 ISH 方法进行确认，

入组受试者为浸润性乳腺癌患者，样本类型为 FFPE 组织切片，入组样本肿瘤细胞百分比满足说明书要求，临床试验纳入统计样本共计 1193 例，其中 ER IHC 阳性 813 例，ER IHC 阴性 380 例；PR IHC 阳性 705 例，PR IHC 阴性 488 例；HER-2 阳性 343 例，HER-2 阴性 839 例；Ki-67 IHC 阳性 928 例，Ki-67 IHC 阴性 265 例。试验结果显示，试验体外诊断试剂与临床参考标准对于 ESR1(ER)检测阳性符合率 94.34%(95%CI: 92.52%, 95.83%)，阴性符合率 96.58% (95%CI: 94.22%, 98.17%)；对于 PGR (PR) 检测阳性符合率 94.75% (95%CI: 92.84%, 96.28%)，阴性符合率 86.48% (95%CI: 83.12%, 89.38%)；对于 ERBB2 (HER-2) 检测阳性符合率 83.67% (95%CI: 79.33%, 87.42%)，阴性符合率 99.64% (95%CI: 98.96%, 99.93%)；对于 MKI67 (Ki-67) 检测阳性符合率 93.53% (95%CI: 91.76%, 95.03%)，阴性符合率 80.38% (95%CI: 75.08%, 84.98%)。试验体外诊断试剂与临床参考标准对于乳腺癌 LuminalA、LuminalB (HER-2 阴性)、LuminalB (HER-2 阳性)、HER-2 阳性 (非 Luminal)、三阴性 (Basal-like 型) 分子分型判定的总符合率为 80.98% (95%CI: 78.60%, 83.20%)。为了更充分地评价试验体外诊断试剂对于 MKI67 的检测性能，进一步采用 IKWG 全片评分方法判读结果作为对照，共进行对比试验 350 例，阳性 181 例，阴性 179 例，试验结果显

示阳性符合率 95.58% (95%CI: 91.48%, 98.07%), 阴性符合率 96.09% (95%CI: 92.11%, 98.41%)。针对所有不一致结果均进行了合理的解释分析。

对比试验中针对试验体外诊断试剂检测结果 (40- $\Delta\Delta Cq$) 与 IHC 检测报告的阳性细胞百分比或 IHC 评分结果 (0、1+、2+、3+) 进行一致性分析, 结果标明两者在趋势上具有一定的相关性。

针对所有入组受试者进行生存分析, 结果显示采用试验体外诊断试剂和临床参考标准进行分子分型后, 相同分型亚组人群的 5 年无病生存期 (DFS) 无显著差异, 五种分子分型 5 年 DFS 与既往报道基本一致, 其中 LuminalA 预后最好, Basal-like 预后最差。

该产品境外临床评价针对乳腺癌高复发率的人群进行试验体外诊断试剂检测, 结果显示基于试验体外诊断试剂进行分子分型后, LuminalA 型较其他各型有更好的 5 年无远处转移生存期 (DDFS) 和总生存期 (OS); MKI67 阳性组和 Ki-67 阳性组预后均较阴性组更差, 同时 MKI67 阳性组较 Ki-67 阳性组五年 DDFS 或 OS 事件数更多。MKI67 预后效果优于 Ki-67。

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产品的

安全风险分析方式进行风险分析。

(一) 受益评估

该产品适用于免疫组化（IHC）不易判定或结果不满意，以及 IHC 结果与治疗预期有较大差别的病例，以进一步辅助判断乳腺癌分子分型。检测结果仅供临床参考，不能作为患者个体化治疗的唯一依据。本产品检测结果不能替代 IHC。临床医生应结合临床表现及实验室检测指标等因素进行综合判断。其临床应用的主要受益在于：目前临床上广泛使用的乳腺癌分子分型的方法为免疫组织化学法（IHC），但该方法的确存在主观判断的影响，部分标志物 IHC 检测重复性不佳。本产品可针对 IHC 不易判定或结果不满意，以及 IHC 结果与治疗预期有较大差别的病例样本进行进一步检测，辅助判断分子分型，提高乳腺癌分子分型准确性，从而协助医生制定合理的诊疗方案。

(二) 风险评估

该产品主要风险在于因对于四项 mRNA 检测结果存在假阴性或假阳性，而导致分子分型判断不准确，进而可能导致患者得不到最优的治疗方案。目前临床上乳腺癌分子分型的金标准 IHC 同样存在上述风险。另外，申请人对已知危险（源）进行风险评估，按照风险可接受准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可降低的风险、不经过风险/受益分析既

判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。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. 产品说明书中明确适用人群为“IHC 不易判定或结果不满意，以及 IHC 结果与治疗预期有较大差别的病例”，并明确声明该产品不能替代 IHC，只能作为 IHC 的补充辅助判断分子分型。

2. 浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本中 mRNA 的含量会受到肿瘤组织比例和导管原位癌组织比例的影响，应使用肿瘤组织比例 $\geq 20\%$ 、导管原位癌组织比例 $\leq 40\%$ 的样本，并且应尽快进行检测，如不能马上进行检测，所提取的核酸应立即保存在 -20°C 或 -80°C 以下的环境内，避免反复冻融，保存时间不应超过 6 个月。

3. 本试剂盒试剂均经过特别配制，随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能导致实验失败。不同批号试剂盒组分不可相互混用。

4. 本试剂盒检测标本为浸润性乳腺癌 FFPE 切片样本提取的 RNA，操作者应将其视为潜在传染源，并严格按照生物制品安全操作规范操作。实验完毕后使用消毒剂处理工作台及相应的器具，避免传染。

综合评价意见

本申报项目为境外第三类体外诊断试剂产品注册，属于创新医疗器械（编号：201600065）。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第5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资料进行系统评价，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。

2023年12月14日

附件：产品说明书

人乳腺癌分子分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：人乳腺癌分子分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

英文名称：Human Breast Cancer Molecular Subtyping Quantitative Detection Kit(PCR- Fluorophore-labeling Probes)

【包装规格】

10 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外半定量检测浸润性乳腺癌 FFPE 组织切片样本中基因 ERBB2（HER2）、ESR1（ER）、PGR（PR）以及 MKI67（Ki-67）的 mRNA 表达水平。

本产品适用于免疫组化（IHC）不易判定或结果不满意，以及 IHC 结果与治疗预期有较大差别的病例，以进一步辅助判断乳腺癌分子分型。检测结果仅供临床参考，不能作为患者个体化治疗的唯一依据。本产品检测结果不能替代 IHC，只能作为 IHC 的补充。

【检验原理】

本试剂盒通过逆转录实时定量 PCR（RT-qPCR），利用 Taqman 技术对四个目标基因（ERBB2、ESR1、PGR 以及 MKI67）及两个参考基因的 mRNA 表达水平进行定量检测。

每个检测由三个反应体系组成，每个反应体系包含针对两个基因的检测试剂，即在同一个反应管中，通过不同的荧光标记探针可以同时检测两个不同的靶基因。其中一个靶基因使用 FAM 信号进行检测，而另一个使用 HEX 信号检测。使用的水解探针在 3'端进行了荧光基团修饰，3'端添加了淬灭基团。探针完整时，荧光基团的荧光信号被淬灭基团吸收。而当探针在 PCR 扩增过程中特异性结合到目标序列上，DNA 聚合酶的 5'端→3'端外切酶活性将探针酶切降解，使得荧光基团和淬灭基团分离，荧光基团发出荧光。在每轮 PCR 循环结束时测得的荧光信号值与合成的目标产物成正比。在 PCR 反应过程中，荧光信号超过背景信号所需的 PCR 反应循环数被用

来测定反应开始时待检核酸的分子数。在具体表达分析中，靶基因（四个分子标志物基因）的 Cq 值和内参基因（两个 house-keeping 基因）的 Cq 值的差值 (ΔCq) 可以作为 RNA 起始值变化的补偿值，使所有测试可以保持同一起始值。此外， ΔCq 再减掉一个校准值，可以修正同一个制造商的不同仪器间的运行差异以及同一仪器不同运行次数间的差异 ($\Delta\Delta Cq$)。

【主要组成成份】

每个试剂盒包含下列材料（表 1），规格为 10 测试。

表 1: 试剂盒组分

管号	试剂名称	试剂组成	试剂规格	数量
A	酶混合液	逆转录酶, DNA 聚合酶, dNTPs	260 μ l	1 管
B	检测体系混合液 1	DNA 寡核苷酸, qPCR 探针	90 μ l	1 管
C	检测体系混合液 2	DNA 寡核苷酸, qPCR 探针	90 μ l	1 管
D	检测体系混合液 3	DNA 寡核苷酸, qPCR 探针	90 μ l	1 管
E	阳性对照	特异性阳性对照模板 RNA	60 μ l	1 管
F	阴性对照	无 RNA 酶的水	350 μ l	1 管

注意：所有试剂为本检测而设计，仅限本测试使用。为了保证检测能够顺利进行，请勿更换试剂盒内组分。特定批次的试剂只能与相同试剂盒批次的试剂一起使用。

需要但未提供：核酸提取或纯化试剂（国械备 20170951 号）或核酸提取或纯化试剂（浙湖械备 20220013 号）。

【储存条件及有效期】

-15 $^{\circ}$ C 至 -25 $^{\circ}$ C 避光储存，有效期 24 个月。首次打开后，在 -15 $^{\circ}$ C 至 -25 $^{\circ}$ C 避光储存条件下剂保质期为 6 个月。避免试剂反复冻融，冻融次数不超过 3 次。

本试剂盒需要在干冰保存下运输，5 $^{\circ}$ C 及以下 5 天，试剂盒接收后需要立即在 -15 $^{\circ}$ C 至 -25 $^{\circ}$ C 条件下避光保存。

失效日期详见外包装箱。

【适用仪器】

全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480

【样本要求】

本试剂盒适用于手术切除的女性浸润性乳腺癌经福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 的肿瘤组织切片, 其中的肿瘤组织比例 $\geq 20\%$, 导管原位癌组织比例 $\leq 40\%$ 。本试剂盒使用的乳腺癌组织中提取的RNA进行检测, 可以使用核酸提取或纯化试剂进行提取和纯化样本RNA (国械备20170951号)。核酸提取或纯化试剂的洗脱液可以直接用于本试剂盒的检测。石蜡切片样本在 4°C 、 -20°C 或 -80°C 保存期限不超过11个月, 提取后的RNA样品在 -20°C 或 -80°C 冷冻条件下保存时限不超过10个月。除上述RNXtract[®] RNA提取试剂盒外, 以下RNA提取处理试剂经验证也可与本检测试剂盒配合使用:

核酸提取或纯化试剂 (浙湖械备 20220013 号)

【检验方法】

每个试剂盒包含 10 个测试。每次检测至少包含一个待测样本, 一个阳性对照和一个阴性对照 (无核酸酶水)。若试剂盒一次性使用, 则可以最多检测 8 个患者样本; 如果试剂盒分作两次使用, 则两次合计最多可以检测 6 个患者样本; 如果试剂盒分作 3 次使用, 则 3 次合计最多可以检测 4 个患者样本 (详见表格 2)。每检测 1 个样本每个检测体系 (共 3 个检测体系) 需要用 3 个重复 (同时阳性和阴性对照也各需要用 3 个重复), 即检测每个样本用到的每个检测体系的反应数为 $3 \times 3 = 9$ 个反应。

表 2: 每盒试剂可检的样本量

每盒试剂使用次数	阴性对照 (测试数)	阳性对照 (测试数)	可做待检样本量 (个数)
1	1	1	8
2	2	2	6
3	3	3	4

检测准备

1. 对工作区域进行去污染处理以防止样本与试剂的交叉污染或被环境中的 RNA

酶或核酸污染。

- 2.在冰上解冻试剂（避免强光照射）。解冻后轻轻将试剂来回倒置 2-3 次，短暂离心。
- 3.使用前将酶混合液室温平衡 2 分钟，以降低其黏着度。
- 4.准备好仪器配套的 96 孔反应板和密封膜（或 PCR 反应八联管及管盖）。
- 5.准备好保温试剂使用的冰和 96 孔 PCR 反应板的冷却架。

配制 PCR 反应液

重要：进行各种准备工作时样本和试剂需要保持在 0℃ 左右（冰上）环境。

- 单个分子标记基因的检测需要 3 倍单个反应所用的剂量。
- 每个反应体系的预混液（master mix）必须用 1.5ml 的离心管来配制，每个试剂盒最多可检测 8 个患者样本
- 根据待检患者样本的数量，每种试剂的需求量如表 3（包含阴性对照和阳性对照各一个以及 15% 的移液损失）

表 3：检测预混液配制

	待检患者样本数量							
	1	2	3	4	5	6	7	8
水（ μl ）	25.9	34.5	43.1	51.8	60.4	69.0	77.6	86.3
反应体系混合液（ μl ）	25.9	34.5	43.1	51.8	60.4	69.0	77.6	86.3
酶混合液（ μl ）	25.9	34.5	43.1	51.8	60.4	69.0	77.6	86.3
合计（ μl ）	77.7	103.5	129.3	155.4	181.2	207.0	232.8	258.9

- 由于预混液中最后加入酶混合液，因此加入时上下抽吸 5-10 次以使三个组分混合均匀（酶混合液特别粘稠），然后涡旋离心管 3 秒，最后简单离心收集液体至管底。最后将预混液置于冰上保存。

- 为了避免移液错误及数据分析的时候混乱不清，我们强烈建议按下表的标准化布局进行排板。例如：P1-8 为患者样本，PC 为阳性对照，NC 为阴性对照，检测体系 1-3 分别以 3 种颜色分布（见表 4）；

表 4：检测推荐平板标准布局

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	P1	PC	PC	PC								
B	P2	PC	PC	PC								
C	P3	PC	PC	PC								
D	P4	---	---	---								
E	P5	---	---	---								
F	P6	NC	NC	NC								
G	P7	NC	NC	NC								
H	P8	NC	NC	NC								

黄色：检测体系 1；蓝色：检测体系 2；红色：检测体系 3；P1-8: 1-8 号患者

重要：在配制反应板时需保持 0℃！建议使用 96 孔板专用 PCR 冷却架。在较高室温（>30℃）下准备 qPCR 时需使用 2 个冷却架轮流使用。

- 在 PCR 板相应的反应孔内按每孔 7.5μL 体积分别加入 3 个检测体系的预混液，分装时尽量保持枪头靠 PCR 反应孔的同一侧，推荐使用电动移液枪进行分装
- 在样本反应孔的另一侧加入 2.5μL 样本 RNA；在阳性对照（PC）孔的另一侧中加入 2.5μL 阳性对照（PC）；在阴性对照（NC）孔的另一侧中加入 2.5μL 水（NC），推荐使用电动移液枪进行分装
- 用配套的密封膜或密封条进行密封
- 在 96 孔板离心机上离心 10 秒，使 PCR 反应液离心至管底。接着运行实时 PCR 仪进行反应和检测。

PCR 扩增程序设置

1. 荧光 PCR 仪检测通道设定：

同时选择 FAM、HEX 通道，参比染料设置为“无”。

2.反应程序设置如下表 5:

表 5: PCR 反应程序

程序	温度 (°C)	时间	循环数	结束后是否采集荧光
第一步	50	5 分钟	1	否
第二步	95	20 秒	1	否
第三步	95	15 秒	40	否
	60	1 分钟		是

PCR 结果分析

荧光定量 PCR 运行结束后，使用配套软件对本次试验的结果进行分析。

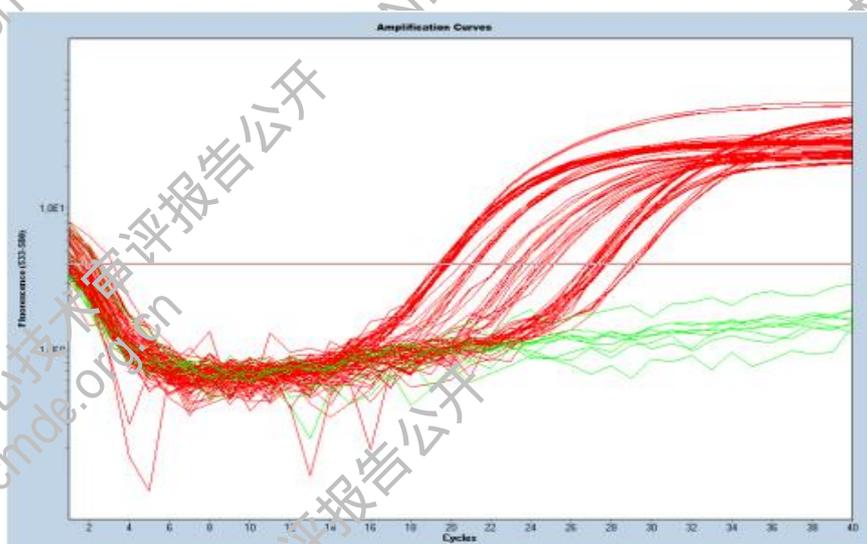
【阳性判断值】

1.设置背景信号值 “noiseband”和阈值“threshold”

背景信号值及阈值需要根据每个仪器单独设定以满足检测。为了保证每台仪器正确的设定，请遵循以下步骤：

最佳的背景信号值/阈值位置稍低于对数线性相位（如图 1）。背景信号值和阈值需要使用相同的数值。

图 1：在全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 上的背景信号值及阈值设置示例



第一次在一台仪器上设定背景信号值及阈值时，需要将 FAM 通道(ERBB2, PGR,

MKI67) 中阳性对照的 C_q 中位值控制在 21.25 左右。但没有必要为了设定一个好的背景信号值及阈值的位置而牺牲其他参数 (即仍需要保证有足够的空间给背景值和平台期)。

背景信号值及阈值的设定后, 阴性、阳性对照结果需符合以下标准:

表 6: 全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 运行有效标准 (1)

检测体系	通道	检测项目	阴性对照	阳性对照
			中间值 C_q	中间值 C_q
1	FAM	<i>ERBB2</i>	40.00	19.75-22.75
	HEX	<i>ESR1</i>	40.00	20.75-23.75
2	FAM	<i>MKI67</i>	40.00	19.75-22.75
	HEX	<i>B2M</i>	40.00	20.75-23.75
3	FAM	<i>PGR</i>	40.00	19.75-22.75
	HEX	<i>CALM2</i>	40.00	19.25-22.25

表 7: 全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 分析仪运行有效标准 (2)

FAM 通道			HEX 通道		
<i>ERBB2</i>	<i>PGR</i>	<i>MKI67</i>	<i>ESR1</i>	<i>B2M</i>	<i>CALM2</i>
-1.00 - 0.60	-0.70 - 0.90	-0.70 - 0.90	-0.30 - 1.30	-0.40 - 1.20	-1.80 - -0.20

FAM 信号: $C_q[\text{分子标记}]$ 中位值 - $C_qs[ERBB2+PGR+MKI67]$ 中位值/3

HEX 信号: $C_q[\text{分子标记}]$ 中位值 - $C_qs[ESR1+B2M+CALM2]$ 中位值/3

2. 结果计算

1) 单个样本的每个分子标记基因结果计算方法如下: 在进行计算前, 对所有反应结果进行简单自定义: 当没有信号被检测到时, 对应检测结果的 C_q 值定义为 40。

首先从 3 个检测体系的 3 次重复检测中获得每个样本/对照的 C_q 值中位值。这样每个样本/对照可获得 6 个 C_q 值中位值: $C_q[ERBB2]$ 中位值、 $C_q[ESR1]$ 中位值、 $C_q[MKI67]$ 中位值、 $C_q[B2M]$ 中位值、 $C_q[PGR]$ 中位值、 $C_q[CALM2]$ 中位值。

每个样本/对照的联合内参值 (CombRef) 由内参基因 *B2M* 和 *CALM2* 的 C_q 中位值取平均得出。

每个样本和阳性对照都有其联合内参值（CombRef 样本和 CombRefPC）

$$[\text{CombRef}] = (\text{Cq} [B2M] \text{中位值} + \text{Cq} [CALM2] \text{中位值}) / 2$$

CombRef 接着用于计算四个分子标记基因的 ΔCq 和 $40-\Delta\Delta\text{Cq}$ 的值：

$$40-\Delta\Delta\text{Cq} = 40 - (\Delta\text{Cq} \text{ 样本} - \Delta\text{Cq} \text{ 阳性})$$

$$40-\Delta\Delta\text{Cq} [ERBB2] = 40 - ((\text{Cq} [ERBB2 \text{ 样本}] \text{中位值} - [\text{CombRef 样本}]) - (\text{Cq} [ERBB2PC] \text{中位值} - [\text{CombRefPC}]))$$

$$40-\Delta\Delta\text{Cq} [ESR1] = 40 - ((\text{Cq} [ESR1 \text{ 样本}] \text{中位值} - [\text{CombRef 样本}]) - (\text{Cq} [ESR1PC] \text{中位值} - [\text{CombRefPC}]))$$

$$40-\Delta\Delta\text{Cq} [PGR] = 40 - ((\text{Cq} [PGR \text{ 样本}] \text{中位值} - [\text{CombRef 样本}]) - (\text{Cq} [PGRPC] \text{中位值} - [\text{CombRefPC}]))$$

$$40-\Delta\Delta\text{Cq} [MKI67] = 40 - ((\text{Cq} [MKI67 \text{ 样本}] \text{中位值} - [\text{CombRef 样本}]) - (\text{Cq} [MKI67PC] \text{中位值} - [\text{CombRefPC}]))$$

2) 单个分子标记基因结果

根据四个分子标记基因定量结果（ $40-\Delta\Delta\text{Cq}$ ），确定样本中各目标基因的表达结果。

表 8：全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 结果判定（ $40-\Delta\Delta\text{Cq}$ ）

	阴性	阳性	
		弱阳	中强阳
ESR1	<36.9	36.9 ~ 38.5	>38.5
PGR	<35.1	35.1 ~ 36.5	>36.5
ERBB2	<41.1	≥ 41.1	
MKI67	<35.9	35.9 ~ 37.2	>37.2

3. 分子分型

四个分子标记基因检测结果根据中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范（St Gallen 共识或中国临床肿瘤学会（CSCO）乳腺癌诊疗指南）对肿瘤样本进行分子分型。

表 9：圣加仑分型标准

ERBB2	ESR1	PGR	MKI67	圣加仑分型 ¹
阳性	阳性	阳性	阳性	Luminal B 型 (HER2 阳性)
阳性	阳性	阳性	阴性	Luminal B 型 (HER2 阳性)
阳性	阳性	阴性	阳性	Luminal B 型 (HER2 阳性)
阳性	阳性	阴性	阴性	Luminal B 型 (HER2 阳性)
阳性	阴性	阳性	阳性	未定义
阳性	阴性	阳性	阴性	未定义
阳性	阴性	阴性	阳性	HER2 阳性 (非 luminal)
阳性	阴性	阴性	阴性	HER2 阳性 (非 luminal)
阴性	阳性	阳性	阳性	Luminal B 型 (HER2 阴性)
阴性	阳性	阳性	阴性	Luminal A 型
阴性	阳性	阴性	阳性	Luminal B 型 (HER2 阴性)
阴性	阳性	阴性	阴性	Luminal B 型 (HER2 阴性)
阴性	阴性	阳性	阳性	未定义
阴性	阴性	阳性	阴性	未定义
阴性	阴性	阴性	阳性	三阴性 (导管的)
阴性	阴性	阴性	阴性	三阴性 (导管的)

表 10: 中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范分子分型标准

分子分型	标志物	备注
Luminal A 型	‘Luminal A 样’ ER/PR 阳性且 PR 高表达 HER2 阴性 Ki67 低表达	ER、PR、Ki67 表达的判定值建议采用报告阳性细胞的百分比。Ki67 高低表达的判定值在不同病理实验中心可能不同，可统一采用 20%~30% 作为判断 Ki67 高低的界值。同时，以 20% 作为 PR 表达高低的判定界值*，可进一步区分 Luminal-A 样和 Luminal-B 样(HER-2 阴性)。
Luminal B 型	‘Luminal B 样(HER-2 阴性)’ ER/PR 阳性 HER2 阴性 且 Ki67 高表达或 PR 低表达	上述不满足‘Luminal-A 样’条件的‘Luminal 样’肿瘤均可作为‘Luminal-B 样’亚型。

	‘Luminal B 样(HER-2 阳性)’ ER/PR 阳性 HER2 阳性 (蛋白过表达或基因扩增) 任何状态的 Ki67	
ERBB2+型	‘HER2 阳性’ HER2 阳性(蛋白过表达或基因扩增) ER 阴性和 PR 阴性	
Basal-like 型	‘三阴性(非特殊型浸润性导管癌)’ ER 阴性 PR 阴性	三阴性乳腺癌和 Basal-like 型乳腺癌之间的吻合度约 80%。 但是三阴性乳腺癌也包含一些特殊类型乳腺癌如髓样癌(典型性)和腺样囊性癌, 这类癌的复发转移风险较低。

表 11: 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 乳腺癌诊疗指南分子分型标准

分子分型	指标			
	HER-2	ER	PR	Ki-67
HER-2 阳性 (HR 阴性)	+	-	-	任何
HER-2 阳性 (HR 阳性)	+	+	任何	任何
三阴型	-	-	-	任何
Luminal A 型	-	+	+且高表达	低表达
Luminal B 型 (HER-2 阴性)	-	+	低表达或-	高表达

【检验结果的解释】

1. 待检样本 RNA 量不足或质量太差, 可能导致标准操作下进行的检测其结果无效。

样本的内参基因检测结果应符合以下标准

Cq [B2M 样品]中位值- [CombRefPC] > 8.1 或

Cq [CALM2 样品]中位值- [CombRefPC] > 15.1 意味着样本无效（表明样本量不足）

Cq [B2M 样品]中位值- [CombRefPC] ≤ 8.1 且

Cq [CALM2 样品]中位值- [CombRefPC] ≤ 15.1 意味着样本有效（表明样本量充足）

2. 制作商提供的试剂为检测用最佳浓度，若未按照说明书推荐的检测步骤进行检测，可能导致检测结果受到不利影响。

3. 非专业人员使用可能会影响检测结果。

【检验方法的局限性】

1.人乳腺癌分子分型定量检测试剂盒（PCR-荧光探针法）用于定量检测乳腺癌分子标记基因 *ERBB2*（HER2）、*ESR1*（ER）、*PGR*（PR）及 *MKI67*（Ki67）mRNA 的表达水平。样本为经中性福尔马林固定、石蜡包埋的肿瘤组织切片。其他类型的样本或其它固定方法尚未验证是否适应。

2.试剂盒内的试剂不能用其他批次或其他制造商生产的试剂替代。

3.试剂盒内的试剂需避免反复冻融，冻融次数不得超过3次。

4.本试剂盒检测所用的 FFPE 切片至少含有 20%的肿瘤细胞。

5. 本试剂盒检测无法获得与阳性细胞数、阳性细胞百分比以及表达强度等相关的准确信息。如果样本（切片）选取不当可能导致假阳性或假阴性的判断。

【产品性能指标】

1.外观：试剂盒包装中的内容物包装外观应清洁、无泄漏、无破损；试剂盒、标志、标签字迹应清楚，标签粘贴牢固；试剂盒中的内容物开口处应平滑无毛刺、不应堵塞。

2.线性：4个单独目标基因参考品，IVT RNA 参考品 *ERBB2*，IVT RNA 参考品 *ESR1*，IVT RNA 参考品 *PGR*，IVT RNA 参考品 *MKI67*；2个单独内参基因参考品，IVT RNA 参考品 *B2M*，IVT RNA 参考品 *CALM2*， 10^8 分子/ml 到 10^4 分子/ml 线性范围内，线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。

3.准确度：对 IHC 方法确定的临床样本进行检测，4个目标基因相应各档样品的 $40-\Delta\Delta Cq$ 应该符合分档预期范围，内参基因 Cq[B2M 样品]中位数-[CombRefPC]

(ΔCq) 应 ≤ 8.1 , $Cq[\text{CALM2 样品}] - [\text{CombRefPC}]$ (ΔCq) 应 ≤ 13.1 。

4. 特异性:

(1) 同一肿瘤组织样本去除正常组织成分和未去除正常组织成分的检测结果应保持一致。

(2) 检测大肠杆菌 DH5 α RNA、金黄色葡萄球菌 RNA 样本各 3 个, 6 个目标基因应无扩增信号。

(3) 检测 ESR1 的同源序列 ESR2, AR, PGR, PRR14L, RHBDL3; PGR 的同源序列 ESR1, ESR2, AR;

ERBB2 的同源序列 HER1(EGFR), HER3(ERBB3), HER4(ERBB4), PRER; B2M 的同源序列 HLA-E; CALM2 的同源序列 CALM1, CALM3, 应无扩增信号。

5. 精密度: 分别检测 4 个单独目标基因和 2 个内参基因参考品高低两个浓度, Cq 值的变异系数 (CV,%) $\leq 5\%$ 。

6. 检测限: 4 个目标基因的最低检测限应为 20 分子/孔。用相应检测限参考品 S1、S2、S3 和 S4 检测, S1、S2 和 S3 的 Cq 值应 $Cq < 40$, 有明显扩增曲线, S4 可有或无扩增曲线。

7. 临床试验纳入统计样本共计 1193 例。试验体外诊断试剂与临床参考标准 IHC 方法对于 ESR1 (ER) 检测阳性符合率 94.34% (95% CI: 92.52%, 95.83%), 阴性符合率 96.58% (95% CI: 94.22%, 98.17%); 对于 PGR (PR) 检测阳性符合率 94.75% (95% CI: 92.84%, 96.28%), 阴性符合率 86.48% (95% CI: 83.12%, 89.38%); 对于 ERBB2 (HER-2) 检测阳性符合率 83.67% (95% CI: 79.33%, 87.42%), 阴性符合率 99.64% (95% CI: 98.96%, 99.93%); 对于 MKI67 (Ki-67) 检测阳性符合率 93.53% (95% CI: 91.76%, 95.03%), 阴性符合率 80.38% (95% CI: 75.08%, 84.98%)。试验体外诊断试剂与临床参考标准对于乳腺癌 Luminal A、Luminal B (HER-2 阴性)、Luminal B (HER-2 阳性)、HER-2 阳性 (非 Luminal)、三阴性 (Basal-like 型) 分子分型判定的总符合率为 80.98% (95% CI: 78.60%, 83.20%) 对于 MKI67 的检测性能, 进一步采用 IKWG 全片评分方法判读结果作为对照, 试验结果显示阳性符合率 95.58%

(95% CI: 91.48%, 98.07%), 阴性符合率 96.09% (95% CI: 92.11%, 98.41%)。

【注意事项】

1. 荧光标记探针不能长期暴露在强光辐射下，避免造成荧光信号减弱；
2. 需极力避免试剂、样本、PCR 对照、其他 PCR 产物及 RNA 酶等受到污染。为了避免污染的情况发生，建议在 PCR 前处理区配制 PCR 反应体系，以使其和样本分析区（PCR 后处理区）区隔开，定期对试验区域进行消毒，并使用带有滤芯的移液器吸头，定期更换手套等；
3. PCR 过程中禁止打开反应板；
4. 本试剂盒中提供的检测试剂均为最佳浓度，不可进行进一步稀释以免影响检测结果；
5. 肿瘤样本可能含有非肿瘤组织，须病理医生确定肿瘤样本中肿瘤组织所占比例；
6. 每次检测样本时都带有外源性的对照样本。如果对照样本的结果无效，那么整批 PCR 结果都判为无效。该次样本检测的结果数据也不能用于继续分析；
7. 仅限体外诊断并只能由专业人员使用；
8. 需严格按照说明书中规定的反应时间、温度以及扩增程序操作；
9. 如果试剂盒包装出现破损，请勿使用。如果存在包装瑕疵或组件破损，请立刻联系制造商；
10. 所有废弃物需按照当地规章制度进行处理；
11. 所有试剂仅限本试剂盒检测使用，为保证检测结果准确，请不要替换试剂盒组分。

【参考文献】

1. Allred, D. C. Commentary: Hormone Receptor Testing in Breast Cancer: A Distress Signal from Canada. *The Oncologist* 13, 1134–1136 (2008).
2. Altman, D. G. & Bland, J. M. Measurement in Medicine: the Analysis of Method Comparison Studies. *The Statistician* 32, 307–317 (1983).
3. Goldhirsch, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* 24, 2206–2223 (2013).

4. Goldhirsch, A. et al. Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol* 22, 1736–1747 (2011).
5. Joensuu, H. et al. Fluorouracil, epirubicin, and cyclophosphamide with either docetaxel or vinorelbine, with or without trastuzumab, as adjuvant treatments of breast cancer: final results of the FinHer Trial. *J. Clin. Oncol.* 27, 5685–5692 (2009).
6. Joensuu, H. et al. Adjuvant Docetaxel or Vinorelbine with or without Trastuzumab for Breast Cancer. *New England Journal of Medicine* 354, 809–820 (2006).
7. Kotoula, V. et al. Sample parameters affecting the clinical relevance of RNA biomarkers in translational breast cancer research. *Virchows Arch.* 462, 141–154 (2013).
8. Milde-Langosch, K. et al. Validity of the proliferation markers Ki67, TOP2A, and RacGAP1 in molecular subgroups of breast cancer. *Breast Cancer Res. Treat.* 137, 57–67 (2013).
9. Noske, A. et al. Comparison of different approaches for assessment of HER2 expression on protein and mRNA level: prediction of chemotherapy response in the neoadjuvant GeparTrio trial (NCT00544765) *Breast Cancer Res Treat* (2011)
10. Nitz, U. et al. Final analysis of the prospective WSG-AGO EC-Doc versus FEC phase III trial in intermediate-risk (pN1) early breast cancer: efficacy and predictive value of Ki67 expression. *Ann. Oncol.* 25, 1551–1557 (2014).
11. Perez, E. A. et al. Cardiac Safety Analysis of Doxorubicin and Cyclophosphamide Followed by Paclitaxel With or Without Trastuzumab in the North Central Cancer Treatment Group N9831 Adjuvant Breast Cancer Trial. *JCO* 26, 1231–1238 (2008).
12. Perou, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752 (2000).
13. Polley, M.-Y. C. et al. An international Ki67 reproducibility study. *J. Natl. Cancer Inst.* 105, 1897–1906 (2013).
14. Ries LAG, Young JL, Keel GE, Eisner MP, Lin YD, Horner M-J (editors). SEER

Survival Monograph: Cancer Survival Among Adults: U.S. SEER Program, 1983-2001, Patient and Tumor Characteristics. National Cancer Institute, SEER Program, NIH Pub. No. 07-6215, Bethesda, MD, (2007)

15. Schneeweis et al. A randomized phase II trial of doxorubicin plus pemetrexed followed by docetaxel versus doxorubicin plus cyclophosphamide followed by docetaxel as neoadjuvant treatment of early breast cancer *Ann. Oncol.* 22, 609-617 (2011)

16. Sinn et al. Histologic regression of breast cancer after primary (neoadjuvant) chemotherapy. *Geburtshilfe Frauenheilkd.* 54 (10), 552-8 (1994)

17. Smid, M. et al. Subtypes of Breast Cancer Show Preferential Site of Relapse. *Cancer Res* 68, 3108–3114 (2008).

18. Sørlie, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *PNAS* 98, 10869–10874 (2001).

19. Varga, Z. et al. How Reliable Is Ki-67 Immunohistochemistry in Grade 2 Breast Carcinomas? A QA Study of the Swiss Working Group of Breast- and Gynecopathologists. *PLoS ONE* 7, e37379 (2012).

20. Vermeulen, J. et al. External oligonucleotide standards enable cross laboratory comparison and exchange of real-time quantitative PCR data. *Nucl. Acids Res.* 37, e138–e138 (2009).

21. Vörös, A., Csörgő, E., Nyári, T. & Cserni, G. An intra- and interobserver reproducibility analysis of the Ki-67 proliferation marker assessment on core biopsies of breast cancer patients and its potential clinical implications. *Pathobiology* 80, 111–118 (2013).

【基本信息】

企业名称：BioNTech Diagnostics GmbH

生产地址：Minerva Biolabs GmbH Schkopauer Ring 13 12681 Berlin Deutschland

注册地址：An der Goldgrube 12 D-55131 Mainz Germany

售后服务单位名称：BioNTech Diagnostics GmbH

联系方式：+49 (0) 6131 - 9084 2001

代理机构名称：浙江数问生物技术有限公司

住所：浙江省湖州市德清县阜溪街道长虹中街 333 号 8 幢 1 楼

联系方式：0572-8011901/8033901

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】