受理号：CSZ2400319

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/ROS1/MET/KRAS 基因突变检测试剂盒（多重荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申 请 人 名 称： 厦门艾德生物医药科技股份有限公司

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

一、 申请人名称

厦门艾德生物医药科技股份有限公司

二、申请人住所

厦门市海沧区鼎山路 39 号

三、生产地址

厦门市海沧区鼎山路 39 号

技术审评概述

一、产品概述

（一）产品主要组成成分

本试剂盒包括两个部分：RNA 基因融合检测和 DNA 基因突变检测。

RNA 基因融合检测组成成分包括 LET 反应条 A(LET A)、LET 逆转录液 I、LET 逆转录液 II、LET 逆转录酶、LET 混合酶 A 和 LET 阳性对照 A。LET 逆转录液 I、LET 逆转录液 II 和 LET 逆转录酶用于样本 RNA 逆转录成 cDNA；LET 反应条 A(LET A)和 LET 混合酶 A 用于样本 cDNA 扩增检测。PCR 反应液已预先分装于 PCR 8 联管(LET A)中，8 联管内装有各自相应的 PCR 反应液，RNA 基因融合检测由①号管和⑤~⑦号管 FAM信号指示，①号管和⑤~⑦号管 VIC信号作为内标，扩增的是人类 GUSB 基因保守区段，用于指示 RNA 样本质量和质控实验是否异常，详见表 1 和表 2。

DNA 基因突变检测组成成分包括 LET 反应条 B(LET B)、LET 混合酶 B 和 LET 阳性对照 B。LET 反应条 B(LET B)和 LET 混合酶 B 用于样本 DNA 扩增检测。PCR 反应液已预先分装于 PCR 8 联管(LET B)中，8 联管内装有各自相应的 PCR 反应液，DNA 基因突变检测由①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号指示，①~③号管和⑤号管 VIC 信号作为内标，扩增的是 EGFR、KRAS 和 BRAF 基因保守区段，用于指示 DNA 样本质控实验是否异常，DNA 样本质量由⑧号管 FAM 和 ROX 信号指示，详见表 1 和表 3。

试剂盒采用 8 联 PCR 管设计，管内装有相应的检测试剂。每一例样本检测需要 1 条 LET 反应条 A(LET A)和 1 条 LET 反应条 B(LET B)，

其中LET反应条A在8联PCR管上标识字母“A”，LET反应条B在8联PCR管上标识字母“B”。8联PCR管若一端为平端，另一端为梯形端，则平端为1号管，梯形端为8号管；若PCR管两端各有一个小孔，则小孔居侧端为1号管，小孔居中端为8号管。试剂盒组成详见表1~3。

表1　试剂盒组成

试剂盒组分	主要组成成分	数量/装量
LET反应条A(LET A)	引物、探针、Buffer、dNTPs	12条/35 μL/孔
LET反应条B(LET B)	引物、探针、Buffer、dNTPs	12条/35 μL/孔
LET逆转录液I	引物、Buffer、dNTPs	280 μL/管×1
LET逆转录液II	引物、Buffer、dNTPs	280 μL/管×1
LET逆转录酶	逆转录酶	16 μL/管×1
LET混合酶A	DNA聚合酶、UNG酶	45 μL/管×1
LET混合酶B	DNA聚合酶、UNG酶	45 μL/管×1
LET阳性对照A	细胞系RNA	65 μL/管×1
LET阳性对照B	质粒DNA、野生型DNA	250 μL/管×1

表2　LET反应条A组成

管号	组成成分	检测目标	荧光信号
①	LET反应液A1	*ALK* 基因融合	FAM、VIC
⑤	LET反应液A5	*ROS*1基因融合	FAM、VIC
⑥	LET反应液A6	*ROS*1基因融合	FAM、VIC
⑦	LET反应液A7	*MET*基因14号外显子跳跃突变	FAM、VIC

表3　LET反应条B组成

管号	组成成分	检测目标	荧光信号
①	LET反应液B1	*EGFR*基因突变	FAM、VIC、ROX
②	LET反应液B2	*EGFR*基因突变	FAM、VIC、ROX
③	LET反应液B3	*EGFR*基因突变	FAM、VIC、ROX
⑤	LET反应液B5	*KRAS*基因突变	VIC、ROX
⑧	LET反应液B8	外控	FAM、ROX

说明：不同批号试剂盒中各组分不可相互混用。

（二）产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）样本DNA/RNA中人类*EGFR*、*KRAS*、*ALK*、 *ROS*1基因突变和*MET*基因14号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详见产品说明书。其中*EGFR*基因19号外显子缺失突变和L858R突变可用于盐酸厄洛替尼片和甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*EGFR*基因T790M突变可用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*ALK*基因融合和*ROS*1基因融合可用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；*MET*基因外显子14跳跃突变可用于谷美替尼片和盐酸特泊替尼片的伴随诊断；*KRAS*基因G12C突变可用于枸橼酸戈来雷塞片和格索雷塞片的伴随诊断，具体信息详见表4。

表 4　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	基因变异类型
盐酸厄洛替尼片	*EGFR* 基因 19 号外显子缺失突变和 L858R 突变
甲磺酸奥希替尼片	*EGFR* 基因 19 号外显子缺失突变、L858R 和 T790M 突变
克唑替尼胶囊	*ALK* 基因融合和 ROS1 基因融合
谷美替尼片	*MET* 基因 14 号外显子跳跃突变
盐酸特泊替尼片	
枸橼酸戈来雷塞片	*KRAS* 基因 G12C 突变
格索雷塞片	

（三）产品包装规格

10 测试/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒以 NSCLC FFPE 样本 RNA 和 DNA 为检测对象。

RNA 检测是通过两步 RT-qPCR 方法对样本 RNA 中基因融合进行检测，均由 FAM 信号指示；RNA 各检测管均含有扩增人类管家基因的检测试剂，用于监控样本 RNA 质量和加入情况，均由 VIC 信号指示。

DNA 检测是通过 ADx-ARMS®技术对样本 DNA 中基因突变进行检测，由 FAM 和 ROX 信号分别指示不同突变位点。ADx-ARMS®技术是针对突变位点设计特异的突变检测引物，PCR 扩增时，由于该引物 3'末端的碱基与突变型模板完全配对，引物延伸并扩增出突变模板；而

与野生型模板由于不能完全配对，引物的延伸被阻断，野生型模板扩增被抑制，从而实现基因突变的检测。

本试剂盒 PCR 扩增反应系统同时含有 UNG 酶，可以选择性断裂含有 dU 的 PCR 片段中的尿嘧啶糖苷键，有效降低因 PCR 产物污染产生的假阳性。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1.主要原材料的选择

主要原材料包括引物、探针、DNA 聚合酶、逆转录酶、UNG 酶和 dNTP，这些原材料均为外购方式获得。

自行设计的引物、探针委托专业的合成公司合成，并经 HPLC 纯化获得；DNA 聚合酶、逆转录酶、UNG 酶和 dNTPs 等均由有资质的原料供应商提供。通过功能性试验，申请人筛选出最佳原材料和供应商，同时制定了各主要原材料质量标准并检验合格。

2.企业参考品和对照品的设置情况

申请人设计了完整的企业参考品，包括阳性参考品、阴性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品，除了 2 支阴性参考品为大肠杆菌来源的核酸外，其他参考品均采用临床样本制备而成。阳性参考品共 142 支，包括试剂盒可检出所有融合类型不同融合含量和所有突变类型不同突变比例的 135 支阳性参考品及 7 支双阳性参考品。阴性参考品共 20 支，9 支为临床 FFPE 阴性 RNA，9 支为临床 FFPE 阴性 DNA，另外 2 支分别为非人基因组样本（大肠杆菌）的 RNA 和 DNA。检测限参考品共 45 支，包括试剂盒可检出的所有融合/突变类型。精密度参考品共 28 支，包括阴性精密度参考品、不同突变比例的阳性精密度参

考品。

产品同时设置了阳性对照和阴性对照，用于检测过程中试剂盒和仪器的质量控制。

（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PCR反应体积、逆转录体积、反应液各组分和酶液等使用量研究、核酸和cDNA用量研究、PCR扩增反应条件研究、循环数研究等。

通过功能性实验，确定了最佳的反应体系。申请人根据试剂盒中试剂和组件的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

（三）分析性能评估

分析性能评估内容包括准确度、精密度、最低检测限、分析特异性、核酸提取性能等研究。申请人提交了三批产品在适用机型上的性能评估资料。

准确度研究中，使用3批成品试剂盒在适用机型上对企业阳性参考品、国家阳性参考品和阴性参考品进行检测，检测结果显示阳性参考品符合率、阴性参考品符合率均为100%。

精密度研究中使用3批成品试剂盒在适用机型上对阴性参考品和阳性精密度参考品进行检测，评价本产品批内、批间、日内、日间、人员间、不同PCR仪器、不同地点和再现性精密度，结果显示检测结果符合率均为100%，检测变异系数均不大于5%。

最低检测限研究中，申请人使用不同核酸浓度和不同融合含量及不同突变比例的样本进行检测，采用95%（n=20）的阳性检出率作为标准，初步确定产品最低检测限。然后使用3批成品试剂盒在适用机型上对检测限参考品进行验证。结果为对3300拷贝FFPE DNA样本中

含有1~5%的基因突变和60~600 ng FFPE RNA样本中含有150拷贝RNA均可准确检出。

分析特异性研究包含交叉反应研究和干扰研究。交叉反应研究包括序列相近和具有一定同源性的其他常见突变类型、NSCLC其他常见基因突变类型和非人类基因组基因。申请人使用3批试剂盒对交叉反应样本进行检测，结果显示均无交叉反应。干扰试验结果显示，临床样本中可能存在的外源干扰物质、内源性干扰物质和药物，包括249.6 mg/L紫杉醇、480 mg/L培美曲塞、1200 mg/L吉西他滨、150 mg/L吉非替尼、90 mg/L埃罗替尼、200 mg/L退热净、75 mg/L阿莫西林、71 mg/L头孢克罗、500 mg/L布洛芬、2 g/L血红蛋白、37 mmol/L甘油三酯、21.7 mmol/L乙醇、37 mmol/L二甲苯、0.2 mg/L蛋白酶K和1%液体石蜡、106 CFU/mL大肠杆菌、106 CFU/mL酵母菌和0.1%福尔马林对检测结果均无影响。

申请人采用临床样本对核酸提取试剂盒进行了性能研究，根据与该产品的组合性能研究结果，确定核酸提取试剂符合检测需求。

（四）阳性判断值研究

阳性判断值的建立研究选取了410例NSCLC FFPE样本（用于基因融合检测）和695例NSCLC FFPE样本（用于基因突变检测），分别统计融合反应管FAM和突变反应管FAM/ROX通道Ct值，并计算突变管FAM/ROX通道ΔCt值，通过受试者工作特征（ROC）曲线确定本产品的阳性判断值，再用临床样本对阳性判断值进行验证。最终确定阳性判断值见表5~6。

表5　LET反应条A(LET A)FAM信号结果判定

LET 反应条	①	⑤*	⑥*	⑦

A	*ALK*	*ROS1*	*ROS1*	*MET*
阳性区域	Ct<30	Ct<30	Ct<30	Ct<27
阴性区域	Ct⩾30 或 No Ct	Ct⩾30 或 No Ct	Ct⩾30 或 No Ct	Ct⩾27 或 No Ct
*: ⑤和⑥管中任意一管 Ct<30 时，则判读为 ROS1 基因融合阳性，否则判读为 ROS1 基因融合阴性。				

表 6　LET 反应条 B(LET B)FAM/ROX 信号结果判定

LET 反应条 B			①	②	③	⑤
FAM 信号	阳性 A 区	突变 Ct 值	Ct＜30	Ct＜30	Ct＜30	/
	阳性 B 区	突变 Ct 值	30≤Ct＜33	30≤Ct＜33	30≤Ct＜33	/
		ΔCt Cut-off 值	10	8	8	/
	阴性	突变 Ct 值	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	/
ROX 信号	阳性 A 区	突变 Ct 值	Ct＜30	Ct＜30	Ct＜30	Ct＜29
	阳性 B 区	突变 Ct 值	30⩽Ct＜33	30≤Ct＜33	30⩽Ct＜33	29≤Ct＜32
		ΔCt Cut-off 值	8	9	9	9
	阴性	突变 Ct 值	Ct⩾33 或 No Ct	Ct≥33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	Ct≥32 或 No Ct

样本RNA基因融合阴阳性的判定是根据样本LET反应条A(LET A)①号管和⑤~⑦号管 FAM 信号 Ct 值进行，详见表 5；样本 DNA 基因突变阴阳性的判定是根据样本LET反应条B(LET B)①~③号管FAM和ROX信号和⑤号管的ROX信号的Ct值进行，具体判定详见表6。

（五）稳定性研究

申请人对本产品实时稳定性、运输稳定性、开瓶冻融稳定性和样本稳定性进行了系统的研究，确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

实时稳定性研究：将3批试剂盒储存于规定储存条件下，分别在不同储存时间对物理性能、准确度、特异性、检测限和精密度进行考察，

各项性能指标均符合要求，确定产品在20±5℃条件下，可稳定保存6个月。

此外，申请人对产品的开瓶冻融稳定性、运输稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品性能均能满足产品说明书声称。

三、临床评价概述

申请人在北京肿瘤医院、山西省肿瘤医院、福建医科大学附属协和医院和哈尔滨医科大学附属肿瘤医院共 4 家临床机构完成了临床检测性能的试验，同时通过桥接试验或同步开发的方式完成了伴随诊断意义的研究。本次临床试验分为如下六部分。

第一部分：采用试验体外诊断试剂与实验室参考方法（二代测序）进行对比试验，评价试验体外诊断试剂的临床检测性能。

针对该部分研究，入组病例以非小细胞肺癌患者为主（包括腺癌、鳞癌、腺鳞癌和大细胞癌），样本类型为 FFPE 样本。临床试验纳入统计受试者共 862 例。其中，*EGFR* 基因共检出阳性例数 457 例（包括 G719S 突变阳性 24 例、G719A 突变阳性 26 例、G719C 突变阳性 26 例、19del 突变阳性 195 例、S768I 突变阳性 61 例、T790M 突变阳性 75 例、L858R 突变阳性 135 例、L861Q 突变阳性 62 例）；*ALK* 基因融合阳性 106 例；*ROS1* 基因融合阳性 87 例；*MET* 基因 14 号外显子跳跃突变阳性 91 例。

试验结果显示：*EGFR* 基因突变检测结果，阳性符合率 99.6%(95%CI：98.4%，99.9%)，阴性符合率 100%(95%CI：99.1%，100.0%)；*ALK* 基因融合检测结果，阳性符合率 98.1%(95%CI：93.3%，99.5%)，阴性符合率 99.6%(95%CI：98.8%，99.9%)；*ROS1* 基因融合检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：95.6%，100%)，阴性符合率

99.6%(95%CI：98.9%，99.9%)；*MET* 基因 14 号外显子跳跃突变检测结果，阳性符合率 96.8%(95%CI：91.0%，98.9%)，阴性符合率 100%(95%CI：99.5%，100%)。

针对 *KRAS* 基因 G12C 突变，临床试验纳入统计受试者共 312 例。其中 *KRAS* 基因 G12C 突变阳性 79 例。试验结果显示，*KRAS* 基因 G12C 突变检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：95.4%，100%)，阴性符合率 99.6%(95%CI：97.6%，99.9%)。

第二部分: 采用试验体外诊断试剂与原研伴随诊断试剂进行比较研究，评价试验体外诊断试剂对于盐酸厄洛替尼片、甲磺酸奥希替尼片和克唑替尼胶囊的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用本产品与原研伴随诊断试剂进行一致性研究。入组病例均为非小细胞肺癌患者，主要是药物临床试验适应症人群，样本类型为 FFPE 样本。其中，EGFR 基因突变检测共纳入有效样本 341 例，其中 19del 阳性样本 79 例，EGFR L858R 阳性样本 112 例，T790M 阳性样本 72 例；ALK 基因融合检测纳入有效样本 328 例，阳性 98 例；ROS1 基因融合检测纳入统计分析的有效样本 312 例，阳性 84 例。

试验结果显示：*EGFR* 基因突变检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：98.1%，100.00%)，阴性符合率 99.3%(95%CI：96.3%，99.9%)；*ALK* 基因融合检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：96.2%，100%)，阴性符合率 99.1%(95%CI：96.9%，99.8%)；*ROS1* 基因融合检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：95.6%，100%)，阴性符合率 100%(95%CI：98.3%，100%)。

第三部分：采用桥接研究，评价试验体外诊断试剂对于盐酸特泊替尼片的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用本产品与 CTA 进行一致性研究，共入组药物临床试验中病例的 416 例样本，样本类型为 FFPE 样本。其中阳性样本 138 例，阴性样本 278 例。试验结果显示：试验体外诊断试剂与 CTA 的阳性符合率为 99.3%(95%CI：96.0%，100.00%)，阴性符合率 98.2%(95%CI：95.8%，99.4%)。

另外，针对药物临床试验纳入的 208 例 *MET* 基因 14 号外显子跳跃突变阳性的 FFPE 组织样本，本次桥接试验纳入 132 例，试验体外诊断试剂检测阳性的为 131 例。对于药物临床试验中的主要评价指标，上述 131 个样本来源病例的客观缓解率（ORR）为 53.4%（95%CI: 44.5%，62.2%），与药物临床试验结果基本一致；对于药物临床试验中的其他次要评价指标也进行了充分评价，结果显示，上述 131 个病例的次要评价指标的结果也与药物临床试验中结果基本一致；同时，针对需要进行敏感性和插补分析的情况也进行了分析。

第四部分：采用桥接研究，评价试验体外诊断试剂对于谷美替尼片的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用本产品与 CTA 进行一致性研究，共入组药物临床试验中病例的 217 例样本，其中阳性样本 123 例，阴性样本 94 例，样本类型为 FFPE 样本。试验结果显示：试验用体外诊断试剂与 CTA 的阳性符合率为 100%(95%CI：96.9%，100.00%)，阴性符合率 100%(95%CI：96.1%，100%)。

另外，针对药物临床试验纳入的 79 例 MET 基因 14 号外显子跳跃突变阳性的 FFPE 组织样本，本次桥接试验纳入 69 例，试验体外诊

断试剂检测阳性的为 69 例。对于药物临床试验中的主要评价指标，上述 69 个样本来源病例的客观缓解率（ORR）为 65.2%（95%CI: 52.8%，76.3%），与药物临床试验结果基本一致；对于药物临床试验中的其他次要评价指标也进行了充分评价，结果显示，上述 69 个病例的次要评价指标的结果也与药物临床试验中结果基本一致；同时，针对需要进行插补分析的情况也进行了分析。

第五部分：采用与抗肿瘤药物同步开发的方式，评价试验体外诊断试剂对于枸橼酸戈来雷塞片的伴随诊断性能。

申请人提供了JAB-21822-1002 IIb期关键研究药物临床研究资料。该临床试验是评价枸橼酸戈来雷塞片单药治疗既往经治的KRAS G12C突变的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者有效性和安全性的开放性、单臂的Ⅱb期临床研究。在这项临床试验中，共有117例经中心实验室采用试验体外诊断试剂检测到KRAS G12C突变的NSCLC受试者纳入了有效性统计分析。多中心临床试验结果显示，FAS人群确认的客观缓解率（ORR） 49.6%（95% CI：40.2%，59.0%），中位缓解持续时间14.5个月（95% CI：9.6，NE），中位至缓解时间1.41个月（最大值9.8个月，最小值1.2个月），中位无进展生存期8.2个月（95% CI：5.2，11.1）。

第六部分：采用与抗肿瘤药物同步开发的方式，评价试验体外诊断试剂对于格索雷塞片的伴随诊断性能。

申请人提供了D1553-102关键研究药物临床研究资料。该临床试验是一项开放、单臂、多中心关键性Ⅱ期研究，评估该药物在KRAS G12C突变阳性的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者中的疗效和安全性。在这项临床试验中，共有119例经中心实验室采用试验体外诊断试剂检

测到KRAS G12C突变的NSCLC受试者纳入了有效性统计分析。多中心临床试验结果显示：LAS人群客观缓解率52.0%（95%CI: 42.8%，61.1%），中位缓解持续时间12.45个月（95% CI：8.28，NE），6个月的缓解持续率78.4%（95% CI：65.1%，87.1%）。

综上所述，该产品临床试验设计符合《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求。临床试验结果显示该产品临床性能满足临床要求。

四、产品受益风险判定

根据GB/T 42062-2022 《医疗器械－风险管理对医疗器械的应用》对产品进行风险分析。

（一）受益评估

本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）样本DNA/RNA中人类*EGFR*、*KRAS*、*ALK*、*ROS1*基因突变和*MET*基因14号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详见产品说明书。其中*EGFR*基因19号外显子缺失突变和L858R突变可用于盐酸厄洛替尼片和甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*EGFR*基因T790M突变可用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*ALK*基因融合和*ROS*1基因融合可用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；*MET*基因外显子14跳跃突变可用于谷美替尼片和盐酸特泊替尼片的伴随诊断；*KRAS*基因G12C突变可用于枸橼酸戈来雷塞片和格索雷塞片的伴随诊断。

本产品临床应用的主要受益在于：可以作为盐酸厄洛替尼片、甲磺酸奥希替尼片、克唑替尼胶囊、谷美替尼片、盐酸特泊替尼片、枸橼酸戈来雷塞片和格索雷塞片的伴随诊断试剂对靶向用药人群进行筛选，从而让NSCLC患者获得及时的治疗。

（二）风险评估

申请人对已知危险（源）进行风险评价，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/收益分析即判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施实施验证，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.预期用途：本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）样本DNA/RNA中人类*EGFR*、*KRAS*、*ALK*、*ROS1*基因突变和*MET*基因14号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详见产品说明书。其中*EGFR*基因19号外显子缺失突变和L858R突变可用于盐酸厄洛替尼片和甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*EGFR*基因T790M突变可用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断;*ALK*基因融合和*ROS1*基因融合可用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；*MET*基因外显子14跳跃突变可用于谷美替尼片和盐酸特泊替尼片的伴随诊断；*KRAS*基因G12C突变可用于枸橼酸戈来雷塞片和格索雷塞片的伴随诊断。

本试剂盒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、药物适应症、治疗反应及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

2.警示及注意事项：产品说明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体外诊断试剂产品注册，属于优先审批产品。依据《医疗器械监督管理条例》(国务院令第 739 号)、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》(国家市场监督管理总局令第 48 号)等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，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。

2025 年 10 月 21 日

附件：产品说明书

人 *EGFR*/*ALK*/*ROS1*/*MET*/*KRAS* 基因突变检测试剂盒（多重荧光 PCR 法）

说明书

【产品名称】

通用名称：人*EGFR*/*ALK*/*ROS1*/*MET*/*KRAS*基因突变检测试剂盒（多重荧光PCR法）

【包装规格】

10测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者福尔马林固定石蜡包埋（FFPE）样本DNA/RNA中人类*EGFR*、*KRAS*、*ALK*、*ROS1*基因突变和*MET*基因14号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详见附表1和2。其中*EGFR*基因19号外显子缺失突变和L858R突变可用于盐酸厄洛替尼片和甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*EGFR*基因T790M突变可用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断；*ALK*基因融合和*ROS1*基因融合可用于克唑替尼胶囊的伴随诊断；*MET*基因外显子14跳跃突变可用于谷美替尼片和盐酸特泊替尼片的伴随诊断；*KRAS*基因G12C突变可用于枸橼酸戈来雷塞片和格索雷塞片的伴随诊断，具体信息详见表1。

表 1　伴随诊断用途的基因变异类型及相应的靶向药物

靶向药物	基因变异类型
盐酸厄洛替尼片	*EGFR* 基因 19 号外显子缺失突变和 L858R 突变
甲磺酸奥希替尼片	*EGFR* 基因 19 号外显子缺失突变、L858R 和 T790M 突变
克唑替尼胶囊	*ALK* 基因融合和 *ROS1* 基因融合
谷美替尼片	*MET* 基因 14 号外显子跳跃突变
盐酸特泊替尼片	
枸橼酸戈来雷塞片	*KRAS* 基因 G12C 突变
格索雷塞片	

肺癌是严重危害人类健康的常见恶性肿瘤之一，其中80～85%的肺癌为非小细胞肺癌。NSCLC患者中存在多种基因突变类型，其中*EGFR*、*KRAS*基因突变频率分别为10~50%[1]、5~25%[2-4]，*ALK*、*ROS1*基因融合发生频率分别为3~7%[5-8]和1%[9-10]，*MET*基因14号外显子跳跃突变发生频率约为1%[11]。《非小细胞肺癌NCCN指南》[12]明确指出，驱动基因突变状态是靶向药物治疗的重要疗效预测因子，人类*EGFR*、*KRAS*基因突变，*ALK*、*ROS1*基因融合和*MET*基因14号外显子跳跃突变患者可以从相应酪氨酸激酶抑制剂治疗中获益，在进行靶向治疗前需要对基因的突变状态进行检测，并强烈建议进行更广泛的有效基因的状态检测，因此，对NSCLC患者的多基因突变联合检测可为患者提供更精准的治疗。

本试剂盒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、药物适应症、治疗反应及其它实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

【检验原理】

本试剂盒以 NSCLC FFPE 样本 RNA 和 DNA 为检测对象。

RNA 检测是通过两步 RT-qPCR 方法对样本 RNA 中基因融合进行检测，均由 FAM 信号指示；RNA 各检测管均含有扩增人类管家基因的检测试剂，用于监控样本 RNA 质量和加入情况，均由 VIC 信号指示。

DNA 检测是通过 ADx-ARMS®技术对样本 DNA 中基因突变进行检测，由 FAM 和 ROX 信号分别指示不同突变位点。ADx-ARMS®技术是针对突变位点设计特异的突变检测引物，PCR 扩增时，由于该引物 3'末端的碱基与突变型模板完全配对，引物延伸并扩增出突变模板；而与野生型模板由于不能完全配对，引物的延伸被阻断，野生型模板扩增被抑制，从而实现基因突变的检测。

本试剂盒 PCR 扩增反应系统同时含有 UNG 酶，可以选择性断裂含有 dU 的 PCR 片段中的尿嘧啶糖苷键，有效降低因 PCR 产物污染产生的假阳性。

【主要组成成分】

本试剂盒包括两个部分：RNA 基因融合检测和 DNA 基因突变检测。

RNA 基因融合检测组成成分包括 LET 反应条 A(LET A)、LET 逆转录液 I、LET 逆转录液 II、LET 逆转录酶、LET 混合酶 A 和 LET 阳性对照 A。LET 逆转录液 I、LET 逆转录液 II 和 LET 逆转录酶用于样本 RNA 逆转录成 cDNA；LET 反应条 A(LET A)和 LET 混合酶 A 用于样本 cDNA 扩增检测。PCR 反应液已预先分装于 PCR 8 联管(LET A)中，8 联管内装有各自相应的 PCR 反应液，RNA 基因融合检测由①号管和⑤~⑦号管 FAM 信号指示，①号管和⑤~⑦号管 VIC 信号作为内标，扩增的是人类 *GUSB* 基因保守区段，用于指示 RNA 样本质量和质控实验是否异常，详见表 2 和表 3。

DNA 基因突变检测组成成分包括 LET 反应条 B(LET B)、LET 混合酶 B 和 LET 阳性对照 B。LET 反应条 B(LET B)和 LET 混合酶 B 用于样本 DNA 扩增检测。PCR 反应液已预先分装于 PCR 8 联管(LET B)中，8 联管内装有各自相应的 PCR 反应液，DNA 基因突变检测由①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号指示，①~③号管和⑤号管 VIC 信号作为内标，扩增的是 *EGFR*、*KRAS* 和 *BRAF* 基因保守区段，用于指示 DNA 样本质控实验是否异常，DNA 样本质量由⑧号管 FAM 和 ROX 信号指示，详见表 2 和表 4。

试剂盒采用 8 联 PCR 管设计，管内装有相应的检测试剂。每一例样本检测需要 1 条 LET 反应条 A(LET A)和 1 条 LET 反应条 B(LET B)，其中 LET 反应条 A 在 8 联 PCR 管上标识字母“A”，LET 反应条 B 在 8 联 PCR 管上标识字母“B”。8 联 PCR 管若一端为平端，另一端为梯形端，则平端为 1 号管，梯形端为 8 号管；若 PCR 管两端各有一个小孔，则小孔居侧端为 1 号管，小孔居中端为 8 号管。试剂盒组成详见表 2~4。

表 2　试剂盒组成

试剂盒组分	主要组成成分	数量/装量
LET 反应条 A(LET A)	引物、探针、Buffer、dNTPs	12 条/ 35 μL/孔
LET 反应条 B(LET B)	引物、探针、Buffer、dNTPs	12 条/ 35 μL/孔
LET 逆转录液 I	引物、Buffer、dNTPs	280 μL/管×1
LET 逆转录液 II	引物、Buffer、dNTPs	280 μL/管×1
LET 逆转录酶	逆转录酶	16 μL/管×1
LET 混合酶 A	DNA 聚合酶、UNG 酶	45 μL/管×1
LET 混合酶 B	DNA 聚合酶、UNG 酶	45 μL/管×1
LET 阳性对照 A	细胞系 RNA	65 μL/管×1
LET 阳性对照 B	质粒 DNA、野生型 DNA	250 μL/管×1

表 3　LET 反应条 A 组成

管号	组成成分	检测目标	荧光信号
①	LET 反应液 A1	*ALK* 基因融合	FAM、VIC
⑤	LET 反应液 A5	*ROS1* 基因融合	FAM、VIC
⑥	LET 反应液 A6	*ROS1* 基因融合	FAM、VIC
⑦	LET 反应液 A7	*MET* 基因 14 号外显子跳跃突变	FAM、VIC

表 4　LET 反应条 B 组成

管号	组成成分	检测目标	荧光信号
①	LET 反应液 B1	*EGFR* 基因突变	FAM、VIC、ROX
②	LET 反应液 B2	*EGFR* 基因突变	FAM、VIC、ROX
③	LET 反应液 B3	*EGFR* 基因突变	FAM、VIC、ROX
⑤	LET 反应液 B5	*KRAS* 基因突变	VIC、ROX
⑧	LET 反应液 B8	外控	FAM、ROX

说明：不同批号试剂盒中各组分不可相互混用。

其它需要自备的试剂和耗材有：

1. 厦门艾德生物医药科技股份有限公司的核酸提取试剂（型号：FFPE DNA/RNA；

医疗器械备案号：闽厦械备 20150082 号），货号：8.0223601X036G。

2. 无 DNase 和 RNase 的移液器滤芯吸嘴。

3. 无 DNase 和 RNase 的纯化水。

4. 1×TE（pH8.0）。

【储存条件及有效期】

避光储藏在-20±5℃；有效期为6个月。

开瓶后使用不影响产品有效期。使用完毕后于-20±5℃保存。避免反复冻融，冻融次数不超过5次。

生产日期及有效期至见标签。

【适用仪器】

实时荧光定量 PCR 仪(QuantStudio 5)、全自动医用 PCR 分析系统（SLAN-96S）。

注意：

1. 在 QuantStudio 5 仪器上，本试剂盒仅适用于 Standard 模块（非 Fast 模块），反应程序模式为标准模式。探针模式设置，Reporter：FAM、VIC、ROX；Quencher：None；Passive Reference：None。
2. 使用 SLAN 全自动医用 PCR 分析系统仪器时，探针模式设置为 FAM、VIC、ROX。分析数据时将“Y 轴显示方式”设置为“按选中孔最大 Y 轴显示”，“扩增曲线算法”设置为“绝对荧光值法”再进行实验结果分析。
3. PCR 仪器在使用过程中建议每年校准一次。

【样本要求】

1. 检测样本类型为 NSCLC 的 FFPE 样本。组织样本应选用 10%中性福尔马林缓冲液固定。石蜡包埋样本切片之后建议立即进行检测。
2. 如果是 FFPE 手术切除样本，切片厚度为 5~10 μm，推荐切片用量为 2~6 片；如果是 FFPE 穿刺/活检组织样本，推荐切片厚度为 5 μm，切片用量为 8~15 片。用户可根据样本质量和肿瘤面积对 FFPE 切片的用量做适当调整。
3. FFPE 样本应确定含有足够量的肿瘤细胞（建议含量在 20%以上，如低于此含量，可考虑进行富集）。
4. 建议所用 FFPE 样本常温（10～30℃）保存，保存时间未超过 2 年。
5. DNA 和 RNA 分离完毕后，使用微量紫外分光光度计测定 DNA 和 RNA 的浓

度。RNA 浓度应≥10 ng/μL，DNA 浓度应≥2 ng/μL，建议 DNA 和 RNA 的 OD_{260}/OD_{280} 介于 1.5～2.3 之间。

6. DNA 提取完毕后，建议立即进行检测。检测前，请将石蜡切片样本的 DNA 使用 1×TE（pH8.0）浓度稀释至 2 ng/μL，可根据样本质量对 DNA 上样浓度作适当调整。
7. RNA 提取完毕后，建议立即进行检测。若 RNA 浓度介于 10~100 ng/μL，建议原浓度直接进行检测；若 RNA 浓度大于 100 ng/μL，请用纯化水将 RNA 稀释到 100 ng/μL 后再进行检测。
8. 样本测定完毕后建议立即进行检测，否则请冷冻保存，保存期间避免反复冻融。DNA 于-20±5℃保存时间不超过 6 个月；RNA 于-20±5℃保存时间不超过 3 个月。

【检验方法】

建议在每次 PCR 反应中，每份样本和 LET 阳性对照、阴性对照（NTC，自备纯化水）共同进行分析，阴性对照应平行参与核酸提取过程。

1. 核酸提取

根据【样本要求】，取适量样本至 1.5 mL 离心管中，按照提取试剂盒说明书的操作要求进行核酸提取，并根据提取后的定量浓度，将 RNA 和 DNA 调整至合适的上样浓度，待用。

2. RNA 基因融合检测

2.1 RNA 逆转录：

(1) 取出 LET 阳性对照 A（LET A-PC）、LET 逆转录液 I 和 LET 逆转录液 II，室温解冻后振荡混匀，快速离心 15 秒。

(2) 取出 LET 逆转录酶，快速离心 15 秒，放置于冰架上。

(3) 根据待检样本、阴性对照和 LET 阳性对照 A（LET A-PC）的数量，按照每

测试含有 18.5 μL LET 逆转录液 I 和 0.5 μL LET 逆转录酶比例混合，振荡混匀，快速离心 15 秒；然后将上述混合液以 19 μL/孔分装至 PCR 反应管中，快速离心 15 秒待用。

(4) 根据待检样本、阴性对照和 LET 阳性对照 A（LET A-PC）的数量，按照每测试含有 18.5 μL LET 逆转录液 II 和 0.5 μL LET 逆转录酶比例混合，振荡混匀，快速离心 15 秒；然后将上述混合液以 19 μL/孔分装至 PCR 反应管中，快速离心 15 秒待用。

(5) 分别移取 6 μL 待检样本 RNA、阴性对照和 LET 阳性对照 A（LET A-PC）至上述 PCR 反应管中，快速离心 15 秒。

(6) 42℃，1 小时；95℃，5 分钟后冰上冷却，得到的 cDNA 溶液用于 PCR 扩增。得到的 cDNA 溶液分别命名为 S1-cDNA1、S2-cDNA1、…、 Sn-cDNA1、N-cDNA1、P-cDNA1 和 S1-cDNA2、S2-cDNA2、…、Sn-cDNA2、N-cDNA2、P-cDNA2。

2.2 cDNA PCR 检测：

(1) 取出 LET 混合酶 A，快速离心 15 秒，放置于冰架上。

(2) 分别移取 1.3 μL LET 混合酶 A 至 cDNA 溶液（S1-cDNA1、S2-cDNA1、…、Sn-cDNA1、N-cDNA1、P-cDNA1 和 S1-cDNA2、S2-cDNA2、…、Sn-cDNA2、N-cDNA2、P-cDNA2），振荡混匀后快速离心 15 秒，分别命名为 S1-Mix A1、S2-Mix A1、…、Sn-Mix A1、N-Mix A1、P-Mix A1 和 S1-Mix A2、S2-Mix A2、…、Sn-Mix A2、N-Mix A2、P-Mix A2。

(3) 取出相应数量的 LET 反应条 A(LET A)，快速离心 15 秒，放置于 PCR 板架上，使 LET 反应条 A(LET A)的①号管应处于同一排。

(4) 轻轻揭开 LET 反应条 A(LET A)管盖，分别移取 5 μL S1-Mix A1、S2-Mix A1、…、Sn-Mix A1、N-Mix A1、P-Mix A1 至 ①号管中；5 μL S1-Mix A2、S2-Mix

A2、…、Sn-Mix A2、N-Mix A2、P-Mix A2 至⑤~⑦号管中，小心盖上管盖，快速离心 15 秒。

(5) 将 LET 反应条 A(LET A)放入实时 PCR 仪器样本槽中,放置顺序见表 5 中推荐的方法。打开设置窗口，按照表 6 说明的扩增程序进行设置。

3. DNA 基因突变检测

3.1 取出 LET 混合酶 B 和 LET 阳性对照 B（LET B-PC），LET 阳性对照 B 室温解冻后振荡混匀，快速离心 15 秒；LET 混合酶 B 快速离心 15 秒，放置于冰架上。

3.2 分别移取 2.7 μL LET 混合酶 B 至 45 μL 的样本 DNA、45 μL 的阴性对照和 45 μL 的 LET 阳性对照 B（LET B-PC），振荡混匀后快速离心 15 秒，分别命名为 S1-Mix B、S2-Mix B、…、Sn-Mix B、N-Mix B 和 P-MixB。

3.3 取出相应数量 LET 反应条 B(LET B)，快速离心 15 秒，放置于 PCR 板架，使 LET 反应条 B(LET B)的⑧号管应处于同一排。

3.4 轻轻揭开 LET 反应条 B(LET B)管盖，分别移取 5 μL S-Mix B 至①~③、⑤号及⑧号管中；5 μL N-Mix B 至①~③、⑤号及⑧号管中，5 μL P-Mix B 至①~③、⑤号及⑧号管中，小心盖上管盖，快速离心 15 秒。

3.5 将 LET 反应条 B(LET B)放入实时 PCR 仪器的样本槽中，放置顺序见表 5 中推荐的方法。打开设置窗口，按照表 6 说明的扩增程序进行设置。

表 5 PCR 反应板布局

管号	RNA 检测						DNA 检测					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
①	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET A-PC	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET B-PC
②	/	/	/	/	/	/	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET B-PC
③	/	/	/	/	/	/	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET B-PC
④	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
⑤	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET A-PC	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET B-PC
⑥	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET A-PC	/	/	/	/	/	/
⑦	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET A-PC	/	/	/	/	/	/
⑧	/	/	/	/	/	/	样本1	样本2	样本3	样本4	NTC	LET B-PC

表 6 PCR 扩增程序

阶段	循环数	温度和时间	收集信号
1	1	42℃ 5 分钟	/
		95℃ 5 分钟	/
2	10	95℃ 25 秒	/
		64℃ 20 秒	/
		72℃ 20 秒	/
3	36	93℃ 25 秒	/
		60℃ 35 秒	FAM、VIC、ROX
		72℃ 20 秒	/
4	1	40℃ 30 秒	/

【阳性判断值】

1. 确认未选择校正荧光参照，按管号顺序依次选择单一检测反应管单一荧光信号通道进行分析，以阳性对照扩增曲线升起的拐点处为阈值线，同时选择阳性对照反应管、样本反应管和阴性对照反应管，得到各反应管的 Ct 值。
2. 样本 RNA 基因融合阴阳性的判定是根据样本 LET 反应条 A(LET A)①号管和⑤~⑦号管 FAM 信号 Ct 值进行，详见表 7。

表 7　LET 反应条 A(LET A)FAM 信号结果判定

LET 反应条 A	①	⑤*	⑥*	⑦
	ALK	*ROS1*	*ROS1*	*MET*
阳性区域	Ct<30	Ct<30	Ct<30	Ct<27
阴性区域	Ct⩾30 或 No Ct	Ct⩾30 或 No Ct	Ct⩾30 或 No Ct	Ct⩾27 或 No Ct
*：⑤和⑥管中任意一管 Ct<30 时，则判读为 *ROS1* 基因融合阳性，否则判读为 *ROS1* 基因融合阴性。				

3. 样本 DNA 基因突变阴阳性的判定是根据样本 LET 反应条 B(LET B)①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号的 Ct 值进行。

4. LET 反应条 B(LET B)中，首先确定样本①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号各自的 Ct 值，然后确定该样本⑧号管 FAM 和 ROX 信号的 Ct 值。由于样本中突变百分含量各不相同，所得到的突变 Ct 值也各不相同。根据不同的突变 Ct 值，把样本检测结果分为阴性、阳性 A 区及阳性 B 区。具体判定见表 8。

表 8　LET 反应条 B(LET B)FAM/ROX 信号结果判定

LET 反应条 B			①	②	③	⑤
FAM信号	阳性 A 区	突变 Ct 值	Ct＜30	Ct＜30	Ct＜30	/
	阳性 B 区	突变 Ct 值	30⩽Ct＜33	30⩽Ct＜33	30⩽Ct＜33	/
		ΔCt Cut-off 值	10	8	8	/
	阴性	突变 Ct 值	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	/
ROX信号	阳性 A 区	突变 Ct 值	Ct＜30	Ct＜30	Ct＜30	Ct＜29
	阳性 B 区	突变 Ct 值	30⩽Ct＜33	30⩽Ct＜33	30⩽Ct＜33	29⩽Ct＜32
		ΔCt Cut-off 值	8	9	9	9
	阴性	突变 Ct 值	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾33 或 No Ct	Ct⩾32 或 No Ct

ΔCt 值的计算：ΔCt 值=突变 FAM(ROX)Ct 值-外控 FAM(ROX)Ct 值。突变 FAM(ROX)Ct 值是指样本突变信号①~③号管 FAM 或 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号对应的 Ct 值；外控 Ct 值是指样本对应的外控信号⑧号管（FAM 或 ROX 信号）的 Ct 值。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照 FAM、VIC 和 ROX 信号扩增曲线：

（1）阴性对照 LET 反应条 A(LET A)①号管和⑤~⑦号管的 FAM 信号、LET 反应条 B（LET B）①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号 Ct 值均应≥36，若任意一管上述信号 Ct 值＜36，则此次实验结果无效，应重新检测。

（2）阴性对照 LET 反应条 A(LET A)①号管和⑤~⑦号管的 VIC 信号、LET 反应条 B(LET B)①~③号管、⑤号管 VIC 信号和 LET 反应条 B(LET B)⑧号管 FAM 和 ROX 信号 Ct 值应≥36，但若偶尔出现个别反应管信号 Ct 值＜36，因不影响对检测结果的判断，可继续进行分析。

2. 阳性对照 FAM、VIC 和 ROX 信号扩增曲线：

阳性对照 LET 反应条 A(LET A)①号管和⑤~⑦号管的 FAM 和 VIC 信号、LET 反应条 B(LET B)①~③号管的 FAM、VIC 和 ROX 信号、⑤号管的 VIC 和 ROX 信号及⑧号管的 FAM 和 ROX 信号应全部都有扩增曲线升起，且 Ct 值一般小于 25。

3. 样本 RNA 基因融合阴阳性判定：

（1）若 LET 反应条 A(LET A)①号管和⑤~⑦号管 VIC 信号 Ct 值均＜36 且任意一管 Ct 值＜26，则按照表 7 进行分析；

a) 若任意一管 FAM 信号 Ct 值落在阳性区域（详见表 7），则该样本判定为该反应管阳性；

b) 若所有管 FAM 信号 Ct 值均落在阴性区域（详见表 7），则该样本判定为阴性或低于本试剂盒的检测下限。

（2）若 LET 反应条 A(LET A) ①号管和⑤~⑦号管 VIC 信号 Ct 值均≥26 或任意一管 Ct 值≥36，说明 RNA 质量不符合要求或漏加，建议重新检测或重新提取 RNA 进行检测。

4. 样本 DNA 基因突变阴阳性的判定

（1）样本 LET 反应条 B(LET B)①~③号管和⑤号管的 VIC 信号扩增曲线：

a) 若①~③号管和⑤号管 Ct 值均＜36，则继续分析；

b) 若①~③号管和⑤号管任意一管 Ct 值≥36，说明漏加或 DNA 质量不符合要求，建议重新检测或重新提取 DNA 进行检测。

（2）样本 LET 反应条 B(LET B)⑧号管 FAM 信号扩增曲线：

a) 若 17≤⑧号管 FAM 信号的 Ct 值≤24，则按照表 8 继续分析；

b) 若⑧号管 FAM 信号的 Ct 值＜17，说明加入的 DNA 过量，建议减少 DNA 加入量再进行实验。但①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号无升起或者落在阴性区，该实验结果仍然可信；

c) 若⑧号管 FAM 信号的 Ct 值＞24，说明 DNA 质量不符合要求，建议增加 DNA 上样量或重新提取 DNA 后再进行检测。

（3）当样本①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号的 Ct 值都大于或等于阴性临界值时（即落于阴性区，详见表 8），则该样本为阴性或低于本试剂盒的检测下限；

（4）当样本①~③号管 FAM 和 ROX 信号及⑤号管 ROX 信号的某个反应管 Ct 值小于阴性临界值时，按照表 8 进行下列判断：

a) 当某个反应管的 Ct 值小于阳性临界值时（即落于阳性 A 区），则该样本为该反应管对应的突变阳性；

b) 当某个反应管的 Ct 值大于等于阳性临界值且小于阴性临界 Ct 值时（即落于阳性 B 区），则计算该反应管的ΔCt 值。若反应管的ΔCt 值小于相对应的ΔCt Cut-off 值，则该样品也为该反应管对应的突变阳性，即阳性 B 区；反之则为阴性或低于本试剂盒的检测下限。

5. 一个样本可能同时含有 2 个或多个融合或突变类型。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者用药治疗的选择应结合其症状、体

征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 阴性结果不能完全排除突变或融合基因的存在，样本中肿瘤细胞过少，过度降解或扩增反应体系中突变DNA浓度或融合RNA浓度低于检测限亦可造成阴性结果。

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假阴性或者假阳性结果。

4. 肿瘤组织（细胞）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。

5. 试剂盒未涵盖到全部人类 *EGFR* 和 *KRAS* 基因突变、*ALK* 和 *ROS1* 基因融合类型，检测结果为阴性不排除检测者带有这些基因的其它突变或融合类型。

6. 该检测仅限于规定的样本类型及检测系统（包括适用机型、核酸提取试剂、检测方法等）。

7. 本试剂盒仅用于定性检测，不可用于基因分型；仅能检测本试剂盒所包括的已知基因型，不能检测其他未知基因型。

8. 试剂盒同一反应管同一荧光通道可能检测多种突变类型，不同突变类型之间无法区分。

9. 检测结果同时出现多阳性结果，并无预示病情严重程度。

【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，无浑浊和沉淀。

2. 本试剂盒对 3300 拷贝 FFPE DNA 样本中含有 1~5%的基因突变和 60~600 ng FFPE RNA 样本中含有 150 拷贝 RNA 均可准确检出。

3. 用企业参考品进行检测，阳性参考品和阴性参考品符合率 100%。

4. 融合扩增体系均可以耐受 600 ng 及以下的野生型 RNA，突变扩增体系均可以耐受 10 ng 及以下的野生型 DNA。

5. 试剂盒与核酸序列同源性较高的野生型、试剂盒涵盖范围之外的其他常见突变类型、常见突变基因（*NTRK1*、*NTRK2*、*NTRK3*、*RET* 和 *HER2*）和非人源基因组基因之间均无交叉反应。外源与内源性干扰物质，249.6 mg/L 紫杉醇、480 mg/L 培美曲塞、1200 mg/L 吉西他滨、150 mg/L 吉非替尼、90 mg/L 埃罗替尼、200 mg/L 退热净、75 mg/L 阿莫西林、71 mg/L 头孢克罗、500 mg/L 布洛芬、2 g/L 血红蛋白、37 mmol/L 甘油三酯、21.7 mmol/L 乙醇、37 mmol/L 二甲苯、0.2 mg/L 蛋白酶 K 和 1%液体石蜡、10^6 CFU/mL 大肠杆菌、10^6 CFU/mL 酵母菌和 0.1%福尔马林均不会影响试剂盒的检测性能。
6. 对 LET 精密度参考品重复检测 10 次，均能检出阳性，且 Ct 值变异系数（CV，%）小于 5%。
7. 临床试验：

申请人在北京肿瘤医院、山西省肿瘤医院、福建医科大学附属协和医院和哈尔滨医科大学附属肿瘤医院共 4 家临床机构完成了临床检测性能的试验，同时通过桥接试验或同步开发的方式完成了伴随诊断意义的研究。本次临床试验分为如下六部分。

第一部分：采用试验体外诊断试剂与实验室参考方法（二代测序）进行对比试验，评价试验体外诊断试剂的临床检测性能。

针对该部分研究，入组病例以非小细胞肺癌患者为主（包括腺癌、鳞癌、腺鳞癌和大细胞癌），样本类型为 FFPE 样本。临床试验纳入统计受试者共 862 例。其中，EGFR 基因共检出阳性例数 457 例（包括 G719S 突变阳性 24 例、G719A 突变阳性 26 例、G719C 突变阳性 26 例、19del 突变阳性 195 例、S768I 突变阳性 61 例、T790M 突变阳性 75 例、L858R 突变阳性 135 例、L861Q 突变阳性 62 例）；ALK 基因融合阳性 106 例；ROS1 基因融合阳性 87 例；MET 跳跃突变阳性 91 例。

试验结果显示：EGFR 基因突变检测结果，阳性符合率 99.6%(95%CI：98.4%，99.9%)，阴性符合率 100%(95%CI：99.1%，100.0%)；ALK 基因融合检测结果，阳性符合率 98.1%(95%CI：93.3%，99.5%)，阴性符合率 99.6%(95%CI：98.8%，99.9%)；ROS1 基因融合检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：95.6%，100%)，阴性符合率 99.6%(95%CI：98.9%，99.9%)；MET 基因 14 号外显子跳跃突变检测结果，阳性符合率 96.8%(95%CI：91.0%，98.9%)，阴性符合率 100%(95%CI：99.5%，100%)。

针对 KRAS 基因 G12C 突变，临床试验纳入统计受试者共 312 例。其中 KRAS 基因 G12C 突变阳性 79 例。试验结果显示，KRAS 基因 G12C 突变检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：95.4%，100%)，阴性符合率 99.6%(95%CI：97.6%，99.9%)。

第二部分：采用试验体外诊断试剂与原研伴随诊断试剂进行比较研究，评价试验体外诊断试剂对于盐酸厄洛替尼片、甲磺酸奥希替尼片和克唑替尼胶囊的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用本产品与原研伴随诊断试剂进行一致性研究。入组病例均为非小细胞肺癌患者，主要是药物临床试验适应症人群，样本类型为 FFPE 样本。其中，EGFR 基因突变检测共纳入有效样本 341 例，其中 19del 阳性样本 79 例，EGFR L858R 阳性样本 112 例，T790M 阳性样本 72 例；ALK 基因融合检测纳入有效样本 328 例，阳性 98 例；ROS1 基因融合检测纳入统计分析的有效样本 312 例，阳性 84 例。

试验结果显示：EGFR 基因突变检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：98.1%，100.00%)，阴性符合率 99.3%(95%CI：96.3%，99.9%)；ALK 基因融合检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：96.2%，100%)，阴性符合率 99.1%(95%CI：96.9%， 99.8%)；ROS1 基因融合检测结果，阳性符合率 100%(95%CI：95.6%，100%)，阴性符合率 100%(95%CI：98.3%，100%)。

第三部分：采用桥接研究，评价试验体外诊断试剂对于盐酸特泊替尼片的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用本产品与 CTA 进行一致性研究，共入组药物临床试验中病例的 416 例样本，样本类型为 FFPE 样本。其中阳性样本 138 例，阴性样本 278 例。试验结果显示：试验体外诊断试剂与 CTA 的阳性符合率为 99.3%(95%CI：96.0%，100.00%)，阴性符合率 98.2%(95%CI：95.8%，99.4%)。

另外，针对药物临床试验纳入的 208 例 MET 跳跃突变阳性的 FFPE 组织样本，本次桥接试验纳入 132 例，试验体外诊断试剂检测阳性的为 131 例。对于药物临床试验中的主要评价指标，上述 131 个样本来源病例的客观缓解率（ORR）为 53.4%（95%CI：44.5%，62.2%），与药物临床试验结果基本一致；对于药物临床试验中的其他次要评价指标也进行了充分评价，结果显示，上述 131 个病例的次要评价指标的结果也与药物临床试验中结果基本一致；同时，针对需要进行敏感性和插补分析的情况也进行了分析。

第四部分：采用桥接研究，评价试验体外诊断试剂对于谷美替尼片的伴随诊断性能。

针对该部分研究，采用本产品与 CTA 进行一致性研究，共入组药物临床试验中病例的 217 例样本，其中阳性样本 123 例，阴性样本 94 例，样本类型为 FFPE 样本。试验结果显示：试验用体外诊断试剂与 CTA 的阳性符合率为 100%(95%CI：96.9%，100.00%)，阴性符合率 100%(95%CI：96.1%，100%)。

另外，针对药物临床试验纳入的 79 例 MET 跳跃突变阳性的 FFPE 组织样本，本次桥接试验纳入 69 例，试验体外诊断试剂检测阳性的为 69 例。对于药物临床试验中的主要评价指标，上述 69 个样本来源病例的客观缓解率（ORR）为 65.2%

（95%CI：52.8%，76.3%），与药物临床试验结果基本一致；对于药物临床试验中的其他次要评价指标也进行了充分评价，结果显示，上述 69 个病例的次要评价指标的结果也与药物临床试验中结果基本一致；同时，针对需要进行插补分析的情况也进行了分析。

第五部分：采用与抗肿瘤药物同步开发的方式，评价试验体外诊断试剂对于枸橼酸戈来雷塞片的伴随诊断性能。

申请人提供了 JAB-21822-1002 IIb 期关键研究药物临床研究资料。该临床试验是评价枸橼酸戈来雷塞片单药治疗既往经治的 KRAS G12C 突变的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者有效性和安全性的开放性、单臂的Ⅱb 期临床研究。在这项临床试验中，共有 117 例经中心实验室采用试验体外诊断试剂检测到 KRAS G12C 突变的 NSCLC 受试者纳入了有效性统计分析。多中心临床试验结果显示，FAS 人群确认的客观缓解率（ORR） 49.6%（95% CI：40.2%，59.0%），中位缓解持续时间 14.5 个月（95% CI：9.6，NE），中位至缓解时间 1.41 个月（最大值 9.8 个月，最小值 1.2 个月），中位无进展生存期 8.2 个月（95% CI：5.2，11.1）。

第六部分：采用与抗肿瘤药物同步开发的方式，评价试验体外诊断试剂对于格索雷塞片的伴随诊断性能。

申请人提供了 D1553-102 关键研究药物临床研究资料。该临床试验是一项开放、单臂、多中心关键性Ⅱ期研究，评估该药物在 KRAS G12C 突变阳性的局部晚期或转移性非小细胞肺癌患者中的疗效和安全性。在这项临床试验中，共有 119 例经中心实验室采用试验体外诊断试剂检测到 KRAS G12C 突变的 NSCLC 受试者纳入了有效性统计分析。多中心临床试验结果显示：LAS 人群客观缓解率 52.0%（95%CI：42.8%，61.1%），中位缓解持续时间 12.45 个月（95% CI：8.28，NE），6 个月的缓解持续率 78.4%（95% CI：65.1%，87.1%）。

【注意事项】

1.实验前请仔细阅读本说明书。

2.本试剂盒结果会受到样本本身的来源、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 DNA 和 RNA 提取质量、荧光定量 PCR 仪型号、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等限制，可能导致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错误、准确性的局限性。

3.实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项。

4.避免在不必要的情况下冻融试剂盒中的试剂。

5.若提取的 RNA 浓度低于 10 ng/μL，提取的 DNA 浓度低于 2 ng/μL，建议尝试进行检测。

6.超过 2 年的 FFPE 样本提取后的核酸若质量符合要求，建议尝试进行检测。

7.一般 DNA 用量以 10 ng/反应为宜，但对于提取质量较差，应相应增加 DNA 用量。尤其是福尔马林固定的石蜡病理样本，因为福尔马林对 DNA 的交联作用，该类样本中的 DNA 较易片段化和降解，虽然紫外分光光度计测量的浓度 DNA 较高，但实际加入反应中的有效 DNA 量并不足够。

8.本试剂盒 DNA 和 RNA 的检测可单独进行，如仅需要检测 DNA 或 RNA 样本，可分别按照试剂盒 DNA 或 RNA 操作判读标准进行操作分析。

9.本试剂盒所有试剂均经过特别配制，以用于上述检测。随意替换试剂盒中的任何试剂，都可能影响使用效果。不要使用超过有效期的试剂。

10. 运输稳定性考察结果显示，运输温度不超过25℃，运输时间不超过7天，运输后试剂盒储存至效期末，性能未发生变化。

11. 应该严格区分阳性对照和反应试剂的使用，防止污染试剂，造成假阳性。

12. 实验时注意防止外源核酸对试剂的污染，注意先加完样本 DNA 和 RNA 后再进行阳性对照的操作。推荐在制备反应试剂和添加 DNA 和 RNA 模板时，使用

单独、专用的移液器和滤芯吸嘴。进行反应试剂制备的地点应当与添加模板的地点相隔离。

13. 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器。

14. 所有化学药品都具有潜在的危险性。具有 PCR 实验室上岗证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、并佩戴一次性手套等防护性措施。产品在正确使用过程中不慎溅入眼内应立即用冲眼器或大量清水冲洗眼睛。

15. 所有检测样本和试剂盒中的阳性对照应视为具有传染性物质，操作和废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

16. 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】

：保持干燥； ：向上； ：易碎，小心轻放； ：避光存放。

【参考文献】

[1] Hirsch, F. R. and P. A. Bunn, Jr. (2009). Lancet Oncol 10(5): 432-433.

[2] Li, M., L. Liu, et al. (2009). Oncol Rep 22(5): 1013-1020.

[3] Renaud, S., J. Seitlinger, et al. (2017). J Thorac Dis 9(4): 957-960.

[4] Del Re, M., E. Rofi, et al. (2018). Oncotarget 9(5): 6630-6643.

[5] Perner, S., P. L. Wagner, et al. (2008). Neoplasia 10(3): 298-302.

[6] Kwak, E. L., Y. J. Bang, et al. (2010). N Engl J Med 363(18): 1693-1703.

[7] Paik, J. H., G. Choe, et al. (2011). J Thorac Oncol 6(3): 466-472.

[8] Rodig, S. J., M. Mino-Kenudson, et al. (2009). Clin Cancer Res 15(16): 5216-5223.

[9] Takeuchi, K., M. Soda, et al. (2012). Nat Med 18(3): 378-381.

[10] Bergethon, K., A. T. Shaw, et al. (2012). J Clin Oncol 30(8): 863-870.

[11] Liu, S. Y., L. Y. Gou, et al. (2016). J Thorac Oncol 11(9): 1503-1510.

[12] NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Version 7. 2019.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：厦门艾德生物医药科技股份有限公司

住所：厦门市海沧区鼎山路 39 号

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：厦门市海沧区鼎山路 39 号

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】

附表 1：LET 反应液 A 检测融合类型

<table>
<tr><th>检测目标</th><th>融合类型</th><th>检测目标</th><th>融合类型</th></tr>
<tr><td rowspan="12">① FAM
ALK</td><td>*EML4* exon13;*ALK* exon20</td><td rowspan="6">⑤ FAM
ROS1</td><td>*SLC34A2* exon13 del2046;*ROS1* exon32</td></tr>
<tr><td>*EML4* exon13;ins69 *ALK* exon20</td><td>*CD74* exon6;*ROS1* exon32</td></tr>
<tr><td>*EML4* exon6 ins33;*ALK* exon20</td><td>*SDC4* exon2;*ROS1* exon32</td></tr>
<tr><td>*EML4 exon6;ALK exon19*</td><td>*SLC34A2* exon13 del2046;*ROS1* exon34</td></tr>
<tr><td>*EML4 exon6;ins18 ALK exon20*</td><td>*CD74 exon6*;*ROS1* exon34</td></tr>
<tr><td>*EML4* exon20;*ALK* exon20</td><td>*EZR* exon10;*ROS1* exon34</td></tr>
<tr><td>*EML4 exon20;ins18 ALK exon20*</td><td>⑥ FAM
ROS1</td><td>*TPM3* exon8;*ROS1* exon35</td></tr>
<tr><td>*EML4* exon18;*ALK* exon20</td><td>⑦ FAM
MET</td><td>*MET* Exon14 skipping</td></tr>
<tr><td>*EML4* exon2;*ALK* exon20</td><td rowspan="4">/</td><td rowspan="4">/</td></tr>
<tr><td>*EML4 exon2;ins117 ALK exon20*</td></tr>
<tr><td>*EML4* exon6;*ALK* exon20</td></tr>
<tr><td>*KLC1* exon9;*ALK* exon20</td></tr>
</table>

附表 2：LET 反应液 B 检测突变类型

管号/信号	检测基因	突变类型	碱基变化	**Cosmic ID**	公司命名	检测限
① FAM	*EGFR* Exon 19	E746_A750del (1)	2235_2249del15	6223	E-19-M1	1%
		E746_A750del (2)	2236_2250del15	6225	E-19-M2	1%
		L747_P753>S	2240_2257del18	12370	E-19-M3	1%
		E746_T751>I	2235_2252>AAT(complex)	13551	E-19-M4	1%
		E746_T751del	2236_2253del18	12728	E-19-M5	1%
		E746_T751>A	2237_2251del15	12678	E-19-M6	1%
		E746_S752>A	2237_2254del18	12367	E-19-M7	1%
		E746_S752>V	2237_2255>T(complex)	12384	E-19-M8	1%
		E746_S752>D	2238_2255del18	6220	E-19-M9	1%
		L747_E749del	2239_2247del9	6218	E-19-M12	1%
		L747_T751del	2239_2253del15	6254	E-19-M13	1%
		L747_S752del	2239_2256del18	6255	E-19-M14	1%
		L747_A750>P	2239_2248TTAAGAGAAG>C(complex)	12382	E-19-M15	2%
		L747_T751>S	2240_2251del12	6210	E-19-M17	1%
		L747_T751del	2240_2254del15	12369	E-19-M18	1%
		L747_T751>P	2239_2251>C(complex)	12383	E-19-M19	1%
		L747_T751del	2238_2252del15	23571	E-19-M20	1%
① ROX	*EGFR* Exon 20	S768I	2303G>T	6241	E-20-M2	2%
② FAM	*EGFR* Exon 21	L858R	2573T>G	6224	E-21-M1	1%
② ROX	*EGFR* Exon 18	G719A	2156G>C	6239	E-18-M1	2%
		G719S	2155G>A	6252	E-18-M2	5%
		G719C	2155G>T	6253	E-18-M3	2%
③ FAM	*EGFR* Exon 20	T790M	2369C>T	6240	E-20-M1	2%
③ ROX	*EGFR* Exon 21	L861Q	2582T>A	6213	E-21-M2	1%
⑤ ROX	*KRAS* Exon 2	G12C	34G>T	516	KRAS-M6	2%