

受理号：CSZ2100333

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 BRAF/TERT/CCDC6-RET 基因突变检测试
剂盒（荧光 PCR 法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：上海睿璟生物科技有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

四、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	15

基本信息

一、申请人名称

上海睿璟生物科技有限公司

二、申请人住所

上海市闵行区召楼路 3632 号 2 棟 5 层

三、生产地址

上海市闵行区召楼路 3632 号 2 棟 5 层

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：BRAF V600E 反应液、TERT C228T 反应液、TERT C250T 反应液、CCDC6-RET 反应液、PCR Mix 1、PCR Mix 2、酶液、阳性对照，详见表 1。

表1. 产品主要组成成分

序号	组成	主要成分	标示量	数量
1	BRAF V600E 反应液	引物、荧光探针	140 μL	1 管
2	TERT C228T 反应液	引物、荧光探针	140 μL	1 管
3	TERT C250T 反应液	引物、荧光探针	140 μL	1 管
4	CCDC6-RET 反应液	引物、荧光探针	100 μL	1 管
5	PCR Mix 1	DNA 聚合酶、dNTPs、dUTP、UDG 酶	600 μL	1 管
6	PCR Mix 2	dNTPs、dUTP	200 μL	1 管
7	酶液	逆转录酶、UDG 酶、DNA 聚合酶	40 μL	1 管
8	阳性对照	突变质粒、RNA 混合液	120 μL	1 管

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本中 BRAF 基因的 V600E 突变、TERT 基因的 C228T 和 C250T 突变以及 CCDC6-RET 融合。

本产品用于细针穿刺活检不能确定良恶性的 Bethesda 报告 III 类和 V 类人群的甲状腺癌的辅助诊断。

本产品检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊断的唯一依据，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。

(三) 产品包装规格

20 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒采用荧光 PCR 检测技术，针对 BRAF 基因突变、TERT 基因突变和 CCDC6-RET 基因融合进行定性检测。

针对 BRAF 和 TERT 基因突变设计相应的突变检测 ARMS 引物，在 PCR 扩增过程中，首先 ARMS 引物特异性识别对应的突变位点，高特异性的 DNA 聚合酶对 ARMS 引物识别的突变位点进行延伸，延伸的同时 TaqMan 探针被水解，荧光基团脱离，释放出荧光信号，实时荧光检测系统进行荧光信号的采集，通过荧光信号和扩增曲线来确定检测样本中是否存在 BRAF、TERT 基因突变。针对 CCDC6-RET 融合突变，分别在融合位点 5' 端的 CCDC6

基因外显子和 3' 端的 RET 基因外显子区设计上下游引物，当基因发生融合时上下游引物结合到同一 mRNA 靶序列上进行扩增，TaqMan 探针水解释放荧光信号。

本试剂盒检测突变靶基因的 TaqMan 探针均以 FAM 荧光进行标记。此外，试剂盒各位点检测体系中同时还包含扩增管家基因的 DNA 或 RNA 内参引物，以及用 VIC 荧光进行标记的探针，用来监控加入体系中的 DNA 和 RNA 质量，内标基因：DNA 检测体系内参为 ACTB 基因，RNA 检测体系内参为 ABL 基因。试剂盒中还提供 4 个位点突变质粒 DNA 和体外转录融合 RNA 混合的阳性对照，在每次实验中均应同时检测阳性对照和阴性对照（可以使用提取洗脱液或无核酸酶水），用以对实验试剂及操作过程是否正常进行监控。反应体系中还含有可降解 PCR 产物的 UDG 酶，防止实验室扩增产物气溶胶的污染。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：引物和探针、dNTPs、dUTP、DNA 聚合酶、UDG 酶、逆转录酶、RNA 酶抑制剂。这些原材料均是通过外购的方式获得。

其中引物和探针的序列均由申请人自行设计，由合成公司

经过合成、修饰、纯化方式获得。申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性实验筛选出最佳的主要原材料和供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和质控品设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品、精密度参考品和特异性参考品。

阳性参考品共 13 支，包括不同浓度水平下试剂盒可检出的所有突变或融合类型。

阴性参考品共 2 支，为野生型人基因组 DNA 和野生型人总 RNA。

检测限参考品共 4 支，包括试剂盒可检出的所有突变或融合类型。

精密度参考品共 10 支，包括试剂盒可检出的所有突变或融合类型；包括了一定浓度不同突变频率下的 DNA 样本和一定浓度下不同融合变异拷贝数的 RNA 样本。

特异性参考品共 2 支，包括分别掺入不同交叉突变类型的野生型人基因组 DNA 和野生型人总 RNA 样本。

产品设置了阳性对照和阴性对照（需要但未提供），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适用样本类型的研究、各组分和酶液等使用量的研究、靶基因和内参基因引物及探针浓度的研究、PCR 扩增反应条件的研究、循环数研究等。

通过功能性实验，最终确定了最佳反应体系。申请人根据试剂盒中试剂及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（阳性符合率、阴性符合率）、精密度、检测限、分析特异性的评估；核酸提取试剂的性能研究；样本保存液的性能研究。

准确度研究使用三批试剂盒分别在两种适用机型上对 36 例临床样本和企业阳性参考品、阴性参考品进行检测，检测结果为各变异类型阳性符合率 100%，阴性符合率 100%。

最低检测限的研究中，申请人分别在两种适用机型上使用不同核酸浓度和不同突变频率/融合拷贝数的样本进行检测，每个浓度或突变频率/融合拷贝数的样本检测 20 次，将检出率大于等于 95% 的最低核酸浓度或最低突变频率/融合拷贝数确定为最低检测限。使用三批试剂盒在两种适用机型上对检测限参考品进行验证。本试剂盒能检测稀释至 5ng/μL 浓度下含 1% 的 BRAF 基因突变、TERT 基因突变临床样本 DNA；以及稀释至 1ng/

μL 浓度下至少 100 拷贝的 CCDC6-RET 融合突变 RNA。

精密度研究使用三批试剂盒分别在两种适用机型上对临床样本和企业精密度参考品进行检测，对三批试剂盒的批次内、批次间、日间、实验室间、仪器间及不同操作者间的精密度进行评价。研究结果显示：三批试剂盒对临床样本和精密度参考品的变异系数均不大于 5.0%。

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/融合变异，以及野生型基因序列。分析特异性使用三批试剂盒分别在两种适用机型上对交叉反应样本进行检测，结果显示均无交叉反应。

干扰研究结果显示，样本中含有以下干扰物：1%的乙醇、1%的样本保存液、50 mg/L 的血红蛋白，对检测结果均无影响。三批试剂盒在两种适用机型上分别检测企业阴性参考品和企业特异性参考品，检测结果均为阴性。

申请人对核酸提取试剂盒与样本保存液性能进行研究，研究结果表明推荐的核酸提取试剂和样本保存液符合检测要求。

（四）阳性判断值或参考区间研究

阳性判断值的建立研究选取了 162 例细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本，分别统计 FAM 通道 Ct 值和 ΔCt 值

($Ct_{FAM}-Ct_{VIC}$)，通过受试者工作特征(ROC)曲线的方式确定本产品的阳性判断值。阳性判断值的验证研究首先选取6例Sanger测序结果阳性的样本稀释至临界Ct值附近，对这些临界阳性样本重复检测20次，分别计算每个样本的阴性和阳性百分比。结果显示，该产品采用Ct值和 ΔCt 值结合的阳性判断值法，能够在不进行复检的情况下，提高临界阳性样本的阳性比例。其次，对1781例临床试验样本的检测结果进行统计分析，进一步对阳性判断值进行验证。最终确定阳性判断值见表2和表3。

若待测样本FAM通道Ct值落在表2范围，判定为相应位点变异阳性；

表2. Ct值阳性判定范围

反应液	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	CCDC6-RET E1-E12
判定标准	$Ct \leq 24$	$Ct \leq 27$	$Ct \leq 26$	$Ct \leq 25$

若待测样本FAM通道Ct值 < 35 且落在表2判读范围外，为疑似阳性，采用 ΔCt 值(FAM通道Ct值-VIC通道Ct值)进行判读：

若 ΔCt 值落在表3范围，判定为相应位点的变异阳性；

表3. ΔCt 值阳性判定范围

反应液	BRAF V600E	TERT C228T	TERT C250T	CCDC6-RET E1-E12
-----	---------------	---------------	---------------	---------------------

判定标准	$\Delta Ct \leq 13$	$\Delta Ct \leq 18$	$\Delta Ct \leq 18$	$\Delta Ct \leq 9$
------	---------------------	---------------------	---------------------	--------------------

若 ΔCt 值落在表 3 范围外，判定为相应位点的变异阴性。

(五) 稳定性研究

稳定性研究包括货架效期稳定性、使用稳定性和样本稳定性。

货架效期稳定性：将三批试剂盒置于规定储存条件下放置 0、3、6、8、10、11、12、16 个月时，每到一个时间节点使用企业参考品对试剂盒的性能进行检测，结果显示试剂盒在生产后保存至 16 个月时各项性能指标均符合产品技术要求，产品有效期可达 12 个月。

使用稳定性研究结果显示，产品的性能均能满足产品说明书的声称。

样本稳定性研究：申请人分别对甲状腺结节细针穿刺活检样本和提取后的核酸样本进行了稳定性研究。最终确定穿刺样本使用睿璟/艾德/海世嘉/天根样本保存液于-15℃以下保存，样本保存时间不超过 6 个月，样本反复冻融不超过 4 次。使用天根样本保存液于 2-8℃保存，样本保存时间不超过 1 个月。提取后的核酸样本于-15℃以下保存，保存时间不超过 6 个月；避免反复冻融，核酸反复冻融不超过 4 次。

三、临床评价概述

申请人在上海市第六人民医院、天津市肿瘤医院和河南省肿瘤医院、上海交通大学医学院附属瑞金医院和上海交通大学医学院附属仁济医院和蚌埠医学院第一附属医院共 6 家机构完成了临床试验。入组患者为细胞学分类为 III 和 V 类的甲状腺癌疑似患者，共计纳入细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本共 1781 例。

采用试验用体外诊断试剂与一代测序进行比较研究试验，验证本产品的临床检测性能。针对 BRAF 基因，申报产品与对比试剂的阳性符合率为 99.3% (95%CI: 98.6%-99.7%)，阴性符合率为 90.6% (95%CI: 88.1%-92.7%)，总符合率为 96.2% (95%CI: 95.3%-97.0%); 针对 TERT C228T 位点，申报产品与对比试剂的阳性符合率为 97.3% (95%CI: 90.8%-99.3%)，阴性符合率为 99.8% (95%CI: 99.5%-99.9%)，总符合率为 99.7% (95%CI: 99.3%-99.9%); 针对 TERT C250T 位点，申报产品与对比试剂的阳性符合率为 95.1% (95%CI: 86.5%-98.3%)，阴性符合率为 99.8% (95%CI: 99.4%-99.9%)，总符合率为 99.6% (95%CI: 99.2%-99.8%); 针对 CCDC6-RET 位点，申报产品与对比试剂的阳性符合率为 96.7% (95%CI: 92.4%-98.6%)，阴性符合率为 99.2% (95%CI: 98.6%-99.5%)，总符合率为 98.9% (95%CI: 98.4%-99.4%)。

采用试验用体外诊断试剂与临床参考标准进行比较研究，验证本产品的临床意义。申报产品的临床灵敏度为 84.3% (95%CI: 82.3%-85.8%)，临床特异度为 98.3% (95%CI: 95.2%-99.4%)。

针对 BRAF 基因，申报产品的临床灵敏度为 75%，临床特异度为 98.3%；针对 TERT 基因，申报产品的临床灵敏度为 8.3%，临床特异度为 100%；针对 CCDC6-RET 位点，申报产品的临床灵敏度为 9.8%，临床特异度为 99.4%。

综上所述，临床试验结果显示本产品的临床性能满足技术审评要求。

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

本产品适用于细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节人群中甲状腺癌的辅助诊断，本产品检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊断的唯一依据，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：该产品为不能确定良恶性的甲状腺结节人群提供一种辅助诊断选择。该试剂盒的临床灵敏度 84.3%，特异性为 98.3%。

(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,对合理可行降低的风险、不经过风险/收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. 甲状腺结节细针穿刺活检样本由于取样量的限制,一般提取的核酸浓度较低,用量不宜低于15ng/反应,应尽量使用较高浓度的样本,并且应尽快进行试验,如不能马上进行试验,所提取的核酸应立即保存在-15°C以下的环境内,避免反复冻融,保存时间不应超过6个月。
2. 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。
3. 本试剂盒检测标本为甲状腺结节细针穿刺活检样本提取的DNA和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

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。

2023年8月14日

附件: 产品说明书

人 BRAF/TERT/CCDC6-RET 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）

产品说明书

【产品名称】

人 BRAF/TERT/CCDC6-RET 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

20 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测细针穿刺活检不能确定良恶性的甲状腺结节样本中 BRAF 基因的 V600E 突变、TERT 基因的 C228T 和 C250T 突变以及 CCDC6-RET 融合。具体检测变异位点类型见下表 1。

表 1 基因突变型别

基因	突变类型	COSMIC ID
BRAF (exon 15)	V600E 突变	COSV56056643
TERT (启动子区)	C228T 突变	COSM1716558
	C250T 突变	COSM1716559
CCDC6-RET 融合	Exon1-Exon12 融合	COSF1271

注：以上基因信息所使用的数据库为 COSMIC 数据库。

本产品用于细针穿刺活检不能确定良恶性的 Bethesda 报告 III 类和 V 类人群的甲状腺癌的辅助诊断。

BRAF 基因编码 MAPK 通路中的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，主要突变类型为 V600E。该突变在临床最常见的甲状腺乳头状癌中发生率为 45-50%，且与肿瘤复发、碘难治、淋巴结转移及肿瘤腺外侵犯等临床不良预后相关¹。

TERT 基因启动子区有 2 个突变位点，分别为转录起始点上游的 -124 (chr5: 1295, 228C>T) 和 -146 (chr5: 1295, 250C>T)，在甲状腺滤泡癌及甲状腺乳头状癌发生率为 10-15%。该基因突变与肿瘤的高侵袭、肿瘤复发和死亡等不良预后相关。BRAF V600E 合并 TERT 基因突变提示高危临床病理特征和恶性不良事件发生率明显增加¹。

RET 融合基因通过信号传导，促使细胞发生恶性转化，其中 CCDC6-RET 融合方式最常见，与放射暴露有关，在无放射暴露史和有放射暴露史的甲状腺乳头状癌中发生率分别为 35-40% 和 50-80%²⁻⁴。

BRAF 基因突变、TERT 基因突变、CCDC6-RET 融合作为甲状腺癌特异性指标，涵盖了大部分甲状腺乳头状癌基因变异形式。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 PCR 检测技术，针对 BRAF 基因突变、TERT 基因突变和 CCDC6-RET 基因融合进行定性检测。

针对 BRAF 和 TERT 基因突变设计相应的突变检测 ARMS 引物，在 PCR 扩增过程中，首先 ARMS 引物特异性识别对应的突变位点，高特异性的 DNA 聚合酶对 ARMS 引物识别的突变位点进行延伸，延伸的同时 TaqMan 探针被水解，荧光基团脱离，释放出荧光信号，实时荧光检测系统进行荧光信号的采集，通过荧光信号和扩增曲线来确定检测样本中是否存在 BRAF、TERT 基因突变。针对 CCDC6-RET 融合突变，分别在融合位点 5' 端的 CCDC6 基因外显子和 3' 端的 RET 基因外显子区设计上下游引物，当基因发生融合时上下游引物结合到同一 mRNA 靶序列上进行扩增，TaqMan 探针水解释放荧光信号。

本试剂盒检测突变靶基因的 TaqMan 探针均以 FAM 荧光进行标记。此外，试剂盒各位点检测体系中同时还包含扩增管家基因的 DNA 或 RNA 内参引物，以及用 VIC 荧光进行标记的探针，用来监控加入体系中的 DNA 和 RNA 质量，内标基因：DNA 检测体系内参为 ACTB 基因，RNA 检测体系内参为 ABL 基因。试剂盒中还提供 4 个位点突变质粒 DNA 和体外转录融合 RNA 混合的阳性对照，在每次实验中均应同时检测阳性对照和阴性对照（可以使用提取洗脱液或无核酸酶水），用以对实验试剂及操作过程是否正常进行监控。反应体系中还含有可降解 PCR 产物的 UDG 酶，有效防止实验室扩增产物气溶胶的污染。

【主要组成部分】

表 2 试剂盒主要组成成分

序号	组成	主要成分	标示量	数量
1	BRAF V600E 反应液	引物、荧光探针	140 μL	1 管
2	TERT C228T 反应液	引物、荧光探针	140 μL	1 管
3	TERT C250T 反应液	引物、荧光探针	140 μL	1 管

反应液				
4	CCDC6-RET 反应液	引物、荧光探针	100 μL	1 管
5	PCR Mix 1	DNA 聚合酶、dNTPs、 dUTP、UDG 酶	600 μL	1 管
6	PCR Mix 2	dNTPs、dUTP	200 μL	1 管
7	酶液	逆转录酶、UDG 酶、DNA 聚合酶	40 μL	1 管
8	阳性对照	突变质粒、RNA 混合液	120 μL	1 管

注：1.不同批号试剂盒中各组分不得互换使用。

2.试剂盒中不含阴性对照，需使用者自备无核酸酶水或提取核酸时所用的核酸洗脱液作为阴性对照。

【储存条件及有效期】

-20±5℃，避光保存；有效期：12 个月；

试剂盒反复冻融次数不能超过 5 次，尽量避免反复冻融；试剂盒开封后于-20±5℃避光保存，保存时间不超过 7 个月 15 天，避免反复冻融，冻融次数不超过 4 次。

生产日期和使用期限见标签；

【适用仪器】

仪器型号：ABI 7500 实时荧光定量 PCR 仪、SLAN-96S

【样本要求】

1. **样本类型：**甲状腺结节细针穿刺活检样本。

2. **样本收集：**样本采集完成后，应尽快保存在样本保存液中*，使用睿璟/艾德/海世嘉/天根样本保存液于-15℃以下保存，样本保存时间不超过 6 个月，样本反复冻融不超过 4 次。使用天根样本保存液于-2~8℃保存，样本保存时间不超过 1 个月。

*样本保存液：

上海睿璟生物科技有限公司，备案号：沪闵械备 20220062 号；

厦门艾德生物医药科技股份有限公司，备案号：闽厦械备 20190183 号；

杭州海世嘉生物科技有限公司，备案号：浙杭械备 20150255 号；

天根生化科技（北京）有限公司，备案号：京昌械备 20220137 号。

3. **样本处理：**使用上海睿璟生物科技有限公司生产的“核酸提取试剂”（备案号：沪闵械备 20200098 号）进行甲状腺结节细针穿刺活检样本的 DNA 和 RNA 提取。提取后的核酸使用紫外光分光光度计进行浓度测定，DNA 浓度不低于 5ng/μL；RNA 浓度不低于 1ng/μL。提取完的核酸样本应立即检测，否则请于-15℃以下保存，保存时间不超过 6 个月，避免反复冻融，核酸反复冻融不超过 4 次。

【检验方法】

1. 试剂准备

1.1 根据测试数量，试剂按 1 个阴性对照、1 个阳性对照及 N 个样本数计算每次实验的测试数量，即 N+2，每个位点分别准备试剂。

1.2 将试剂盒中的各组分，待检测样本及阳性对照平衡到室温，振荡混匀后瞬时离心，按表 3 和表 4 配制每个测试的反应体系，混合液振荡混匀后瞬时离心，随后进行荧光检测。

表 3 DNA 反应体系配制

检测对象	DNA
PCR Mix 1	10 μL
BRAF 或 TERT 反应液	7 μL
样本/阳性对照/阴性对照	3 μL
反应体系总量	20 μL

表 4 RNA 反应体系配制

检测对象	RNA
PCR Mix 2	10 μL
酶液	2 μL

表 5 PCR 扩增反应条件 (20μL)			
流程	步骤	温度, 时间	循环数
Stage1 (防污染/逆转录)		50°C, 10min	1 cycle
Stage2 (预变性)		95°C, 10min	1 cycle
Stage3 (PCR 扩增)	Step1	95°C, 15 sec	
	Step2	66°C, 40 sec	15 cycles
Stage4 (PCR 扩增)	Step1	95°C, 15 sec	
	Step2	60°C, 40 sec (荧光采集)	35 cycles
检测通道			
FAM 和 VIC, 参比荧光设定为 NONE。			

【阳性判断值】

1. 阈值线
阈值线设定在阳性对照扩增曲线升起的拐点处。

2. 阴阳性对照分析
各反应体系阳性对照 FAM 通道 Ct 值 ≤ 25 , 且阴性对照无扩增曲线升起。

3. 检测结果的判定

3.1 结果有效性

3.1.1 若待测样本的判定符合 3.2.1 时, VIC 通道 Ct 值不作为参考标准, 结果均有效。

3.1.2 若待测样本的判定符合 3.2.2 和 3.2.3 时, VIC 通道 Ct 值 ≤ 20 时, 结果有效; 当样本 VIC 通道 Ct 值 > 20 时, 结果无效, 建议增加上样量或重新提取。

3.2 结果判读

3.2.1 若待测样本 FAM 通道 Ct 值落在表 6 范围, 判定为相应位点变异阳性;

表 6 Ct 值阳性判定范围

反应液	BRAF	TERT	TERT	CCDC6-RET
	V600E	C228T	C250T	E1-E12
判定标准	Ct ≤ 24	Ct ≤ 27	Ct ≤ 26	Ct ≤ 25

3.2.2 若待测样本 FAM 通道 Ct 值显示“Undetermined”或“No Ct”时, 判定为相应位点变异阴性。

3.2.3 若待测样本 FAM 通道 Ct 值 < 35 且落在 3.2.1 判读范围外 (灰区), 为疑似阳性, 采用 ΔCt 值 (FAM 通道 Ct 值-VIC 通道 Ct 值) 进行判读:

3.2.3.1 若 ΔCt 值落在表 7 范围, 判定为相应位点的变异阳性;

表 7 ΔCt 值阳性判定范围

反应液	BRAF	TERT	TERT	CCDC6-RET
	V600E	C228T	C250T	E1-E12
判定标准	$\Delta Ct \leq 13$	$\Delta Ct \leq 18$	$\Delta Ct \leq 18$	$\Delta Ct \leq 9$

3.2.3.2 若 ΔCt 值落在表 7 范围外, 判定为相应位点的变异阴性。

【检验结果的解释】

本试剂盒结果会受到样本来源、采集过程、样本质量、运输条件、预处理等因素影响, 同时也受到核酸提取质量、操作环境、样本上样量等限制, 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潜在的错误, 严格按照说明书进行操作。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 不能单独作为诊断或鉴别诊断的依据。为了达到诊断目的, 此检测结果应结合临床检测、病史和其他的检查结果综合考虑。

2. 阴性结果不能完全排除靶基因突变的存在, 样本中肿瘤细胞过少、核酸过度降解或扩增反应体系中靶基因浓度低于检测限亦可造成

阴性结果。

3. 甲状腺结节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。
4. 不规范的样本采集、转运及处理，以及不当的技术操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
5. 本检测试剂 BRAF 基因突变、TERT 基因突变和 CCDC6-RET 融合检测范围仅包括检测试剂明确包含的已知的基因突变位点范围，不包括检测试剂盒申明之外的基因突变位点的检测。

【产品性能指标】

1. 阳性符合率：检测试剂盒范围内国家阳性参考品的 BRAF V600E 阳性参考品 1 支或不同浓度、不同突变频率/拷贝数的企业阳性参考品 13 支，每支参考品检测一次，检测结果均为对应基因变异阳性。
2. 阴性符合率：检测国家阴性参考品 5 支或企业阴性参考品 2 支，每支参考品检测一次，检测结果均为对应基因变异阴性。检测试剂盒范围外的国家阳性参考品 20 支或企业特异性参考品 2 支，每支参考品检测一次，检测结果均为对应基因变异阴性。
3. 精密度：检测中强阳企业精密度参考品、弱阳性企业精密度参考品和阴性企业精密度参考品共 10 支，每支参考品检测 10 次，阳性位点 FAM、VIC 通道及阴性位点 VIC 通道 Ct 值的变异系数 (CV, %) ≤ 5%。
4. 检测限：检测试剂盒范围内的 BRAF V600E 国家检测限参考品（每支参考品检测 1 次）或企业检测限参考品 4 支（每支参考品检测 3 次），检测结果均为对应基因变异阳性。本试剂盒能检测稀释至 5ng/μL 浓度下含 1% 的 BRAF 基因突变、TERT 基因突变临床样本 DNA；以及稀释至 1ng/μL 浓度下至少 100 拷贝的 CCDC6-RET 融合突变 RNA。
5. 干扰分析：评估新鲜组织样本处理过程中可能受乙醇、血红蛋白、RNA 保护液的影响。在样本反应物质中，加入浓度不高于 1% 的乙醇、1% 的样本保存液、50mg/L 的血红蛋白时，检测体系不受影响。
6. 临床试验结果：临床试验在 6 家临床试验机构共同开展，共计入组有效样本 1781 例。以临床参考标准作为对比方法，试验结果显示：本产品的临床灵敏度为 84.3%，特异度为 98.3%。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书。
2. 本产品仅用于体外诊断。
3. 荧光 PCR 法为高灵敏度的实验，需严格按照 PCR 实验室的操作规范分区操作，避免污染。
4. 甲状腺结节细针穿刺活检样本由于取样量的限制，一般提取的核酸浓度较低，用量不宜低于 15ng/反应，应尽量使用较高浓度的样本，并且应尽快进行试验，如不能马上进行试验，所提取的核酸应立即保存在-15℃以下的环境内，避免反复冻融，保存时间不应超过 6 个月。
5. 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。
6. 本试剂盒检测标本为甲状腺结节细针穿刺活检样本提取的 DNA 和 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。
7. 临床实验室应严格按照相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。

【参考文献】

1. Xing MZ. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 2019; 48:109-24.
2. Nikiforov YE. *Endocrine Pathology.* 2002;13(1):3-16.
3. Rabes HM, Demidchik EP, Sidorow JD, et al. *Clin Cancer Res.* 2000;6(3):1093-103.
4. Sahbaz A, Onal B, Yesilyurt A, et al. *Balkan Med J.* 2015;32(2):156-66.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海睿璟生物科技有限公司

注册地址：上海市闵行区召楼路 3632 号 2 幢 5 层

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：上海市闵行区召楼路 3632 号 2 幢 5 层

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】