

受理号：CSZ2200086

# 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 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.....	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 .....	7
三、 临床评价概述.....	12
四、 产品受益风险判定.....	16
综合评价意见.....	19

## 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

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 信号指示，①~

③号管 VIC 信号用于指示 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，小孔居中心端为 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 $\mu$ L/孔
LET 反应条 B(LET B)	引物、探针、Buffer、dNTPs	12 条/ 35 $\mu$ L/孔
LET 逆转录液 I	引物、Buffer、dNTPs	280 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 逆转录液 II	引物、Buffer、dNTPs	280 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 逆转录酶	逆转录酶	16 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 混合酶 A	DNA 聚合酶、UNG 酶	45 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 混合酶 B	DNA 聚合酶、UNG 酶	45 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 阳性对照 A	细胞系 RNA	65 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 阳性对照 B	质粒 DNA、野生型 DNA	250 $\mu$ L/管 $\times$ 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	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 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
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、ALK、ROS1 和 MET 基因 14 号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详细产品说明书。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。

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（拓得康®）	

### （三）产品包装规格

10 测试/盒。

### （四）产品检验原理

该试剂盒以 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。

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 138 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 132 支阳性参考品及 6 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 44 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 27 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参考品、国家标准品进行检测，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了验证。

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（乙醇、二甲苯、蛋白酶 K、液体石蜡、大肠杆菌、酵母菌、福尔马林）、内源性干扰物质（血红蛋白、甘油三酯）和药物（紫杉醇、培美曲塞、吉西他滨、吉非替尼、埃罗替尼、退热净、阿莫西林、头孢克罗、布洛芬等）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）阳性判断值或参考区间研究

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 640 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  $\Delta$ Ct 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 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 $\geq$ 30 或 No Ct	Ct $\geq$ 30 或 No Ct	Ct $\geq$ 30 或 No Ct	Ct $\geq$ 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
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 $\leq$ Ct<33	30 $\leq$ Ct<33	30 $\leq$ Ct<33
		$\Delta$ Ct Cut-off 值	10	10	8
	阴性	突变 Ct 值	Ct $\geq$ 33 或 No Ct	Ct $\geq$ 33 或 No Ct	Ct $\geq$ 33 或 No Ct
ROX 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 $\leq$ Ct<33	30 $\leq$ Ct<33	30 $\leq$ Ct<33
		$\Delta$ Ct Cut-off 值	8	8	9
	阴性	突变 Ct 值	Ct $\geq$ 33 或 No Ct	Ct $\geq$ 33 或 No Ct	Ct $\geq$ 33 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(LETB)①~③号管 FAM 和 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0、8和10个月对物理性能、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 $20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存8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，同时通过桥接试验的方式在药物临床试验期间完成了伴随诊断意义的研究。本次临床试验分为如下四部分。

第一部分：采用试验体外诊断试剂与临床参考方法(二代测序)等进行对比试验，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；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%)，总符合率为99.8% (95%CI: 99.2% ~ 99.9%)。

ALK基因检测结果，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%)，总符合率为99.4% (95%CI: 98.7% ~ 99.8%); ROS1基因检测结果，阳性符合率100%(95%CI: 95.6% ~ 100%)，阴性符合率99.6%(95%CI: 98.9% ~ 99.9%)，总符合率为99.7% (95%CI: 98.9% ~ 99.9%); MET基因检测结果，阳性符合率96.8%(95%CI: 91.0% ~ 98.9%)，阴性符合率100%(95%CI: 99.5% ~ 100%)，总符合率为99.7% (95%CI: 98.9% ~ 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 基因共纳入有效样本341 例；ALK 融合基因检测纳入有效样本 328例；ROS1 融合基因检测纳入统计分析的有效样本 312 例。

试验结果显示：EGFR基因检测结果，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%)，总符合率为99.7% (95%CI: 98.4% ~ 100%)。ALK基因检测结果，阳性符合率100%(95%CI: 96.2% ~ 100%)，阴性符合率99.1%(95%CI: 96.9% ~ 99.8%)，总符合率为99.4% (95%CI: 97.8% ~ 99.8%)；ROS1基因检测结果，阳性符合率100%(95%CI: 95.6% ~ 100%)，阴性符合率100%(95%CI: 98.3% ~ 100%)，总符合率为100% (95%CI: 98.8% ~ 100%)。

第三部分：采用桥接研究，评价试验体外诊断试剂对于特泊替尼药物的伴随诊断性能。

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。试验结果显示：试验用体外诊断试剂与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%)，总符合率为98.6% (95%CI: 96.9% ~ 99.5%)。

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药物的伴随诊断性能。

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，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%)，总符合率为100% (95%CI: 98.3% ~ 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。

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YY/T 0316-2016《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、ALK、ROS1 和 MET 基因 14 号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详细产品说明书。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。



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、谷美替尼片和盐酸特泊替尼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. 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、ALK、ROS1 和 MET 基因 14 号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详细产品说明书。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。

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。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。

2024 年 9 月 3 日

附件: 产品说明书

## 人 EGFR/ALK/ROS1/MET 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 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、ALK、ROS1 和 MET 基因 14 号外显子跳跃突变，具体突变位点信息详细见附表 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。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	<i>ALK</i> 基因融合和 <i>ROS1</i> 基因融合
谷美替尼片	<i>MET</i> 基因 14 号外显子跳跃突变
盐酸特泊替尼片（拓得康®）	

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* 基因突变频率为 10~50%<sup>[1]</sup>，*ALK*、*ROS1* 基因融合发生频率分别为 3~7%<sup>[2-5]</sup>和 1%<sup>[6-7]</sup>，*MET* 基因 14 号外显子跳跃突变发生频率约为 1%<sup>[8]</sup>。《非小细胞肺癌 NCCN 指南》<sup>[9]</sup>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* 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 信号指示，①~③号管 VIC 信号用于指示 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 $\mu$ L/ 孔
LET 反应条 B(LET B)	引物、探针、Buffer、dNTPs	12 条/ 35 $\mu$ L/ 孔
LET 逆转录液 I	引物、Buffer、dNTPs	280 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 逆转录液 II	引物、Buffer、dNTPs	280 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 逆转录酶	逆转录酶	16 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 混合酶 A	DNA 聚合酶、UNG 酶	45 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 混合酶 B	DNA 聚合酶、UNG 酶	45 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 阳性对照 A	细胞系 RNA	65 $\mu$ L/管 $\times$ 1
LET 阳性对照 B	质粒 DNA、野生型 DNA	250 $\mu$ L/管 $\times$ 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	<i>ALK</i> 基因融合	FAM、VIC
⑤	LET 反应液 A5	<i>ROS1</i> 基因融合	FAM、VIC
⑥	LET 反应液 A6	<i>ROS1</i> 基因融合	FAM、VIC
⑦	LET 反应液 A7	<i>MET</i> 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	<i>EGFR</i> 基因突变	FAM、VIC、ROX
②	LET 反应液 B2	<i>EGFR</i> 基因突变	FAM、VIC、ROX
③	LET 反应液 B3	<i>EGFR</i> 基因突变	FAM、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.  $1 \times TE$  (pH8.0)。

#### 【储存条件及有效期】

避光储藏在  $-20 \pm 5^{\circ}C$ ；有效期为 8 个月。开瓶后使用不影响产品有



效期。使用完毕后于 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 保存。避免反复冻融,冻融次数不超过5次。

试剂盒在运输过程中,需泡沫箱加冰袋运输或者冷链运输,运输时间不超过一周,运输温度不高于 $25^{\circ}\text{C}$ 。

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 $5\sim 10\text{ }\mu\text{m}$ ,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  $\mu\text{m}$ ，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  $\geq 10 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，DNA 浓度应  $\geq 2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，建议 DNA 和 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  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  $2 \text{ ng}/\mu\text{L}$ ，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  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，建议原浓度直接进行检测；若 RNA 浓度大于 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$ ，请用纯化水将 RNA 稀释到 100  $\text{ng}/\mu\text{L}$  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  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$  保存时间不超过 6 个月；RNA 于  $-20 \pm 5^\circ\text{C}$  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  $\mu$ L LET 逆转录液 I 和 0.5  $\mu$ L 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  $\mu$ L/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  $\mu$ L LET 逆转录液 II 和 0.5  $\mu$ L 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  $\mu$ L/孔分装至 PCR 反应管中, 快速离心 15 秒待用。
- (5) 分别移取 6  $\mu$ L 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  $\mu\text{L}$  LET 混合酶 B 至 45  $\mu\text{L}$  的样本 DNA、45  $\mu\text{L}$  的阴性对照和 45  $\mu\text{L}$  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  $\mu\text{L}$  S-Mix B 至①~③及⑧号管中; 5  $\mu\text{L}$  N-Mix B 至①~③及⑧号管中, 5  $\mu\text{L}$  P-Mix B 至①~③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	NT C	LET A-PC	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	LET B- PC
②	/	/	/	/	/	/	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	LET B- PC
③	/	/	/	/	/	/	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	LET B- PC
④	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
⑤	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	LET A-PC	/	/	/	/	/	/
⑥	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	LET A-PC	/	/	/	/	/	/
⑦	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	LET A-PC	/	/	/	/	/	/
⑧	/	/	/	/	/	/	样本 1	样本 2	样本 3	样本 4	NT C	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
	<i>ALK</i>	<i>ROS1</i>	<i>ROS1</i>	<i>MET</i>
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 <i>ROS1</i> 基因融合阳性，否则判读为 <i>ROS1</i> 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

各自的 Ct 值，然后确定该样本③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
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	10	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
	阳性 B 区	突变 Ct 值	30≤Ct<33	30≤Ct<33	30≤Ct<33

	$\Delta Ct$ Cut-off 值	8	8	9
阴性	突变 Ct 值	$Ct \geq 33$ 或 No Ct	$Ct \geq 33$ 或 No Ct	$Ct \geq 33$ 或 No Ct

$\Delta Ct$  值的计算： $\Delta Ct$  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 Ct 值均应  $\geq 36$ ，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 VIC 信号和 LET 反应条 B (LET B) ⑧号管 FAM 和 ROX 信号 Ct 值应  $\geq 36$ ，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  $\leq 36$  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  $\geq 26$  或任意一管 Ct 值  $\geq 36$ ，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 VIC 信号扩增曲线：

a) 若①~③号管 Ct 值均  $< 36$ ，则继续分析；

b) 若①~③号管任意一管 Ct 值  $\geq 36$ ，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  $17 \leq$  ⑧号管 FAM 信号的 Ct 值  $\leq 24$ ，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 信号各管的 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 $\Delta Ct$ 值。若反应管的 $\Delta Ct$ 值小于相对应的 $\Delta Ct$  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*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他突变或融合类型。
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和常见突变基因之间均无交叉反应。主要外源与内源性干扰物质，如紫杉醇、培美曲塞、吉西他滨、吉非替尼、埃罗替尼、退热净、阿莫西林、头孢克洛、布洛芬、血红蛋白、甘油三酯、乙醇、二甲苯、蛋白酶K和液体石蜡、大肠杆菌、酵母菌和福尔马林在建议的干扰物潜在试验终浓度下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，同时通过桥接试验的方式在药物临床试验期间完成了伴随诊断意义的研究。本次临床试验分为如下四部分。

第一部分：采用试验体外诊断试剂与临床参考方法（二代测序）等进行对比试验，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；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%)，总符合率为 99.8% (95%CI: 99.2%~99.9%)”。

ALK 基因检测结果，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%)，总符合率为 99.4% (95%CI: 98.7%~99.8%)；ROS1 基因检测结果，阳性符合率 100%(95%CI: 95.6%~100%)，阴性符合率 99.6%(95%CI: 98.9%~99.9%)，总符合率为 99.7% (95%CI: 98.9%~99.9%)；MET 基因检测结果，阳性符合率 96.8%(95%CI: 91.0%~98.9%)，阴性符合率 100%(95%CI: 99.5%~100%)，总符合率为 99.7% (95%CI: 98.9%~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 基因共纳入有效样本 341

例；ALK 融合基因检测纳入有效样本 328 例；ROS1 融合基因检测纳入统计分析的有效样本 312 例。

试验结果显示：EGFR 基因检测结果，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%)，总符合率为 99.7% (95%CI: 98.4%~100%)”。

ALK 基因检测结果，阳性符合率 100%(95%CI: 96.2%~100%)，阴性符合率 99.1%(95%CI: 96.9%~99.8%)，总符合率为 99.4% (95%CI: 97.8%~99.8%)；ROS1 基因检测结果，阳性符合率 100%(95%CI: 95.6%~100%)，阴性符合率 100%(95%CI: 98.3%~100%)，总符合率为 100% (95%CI: 98.8%~100%)。

第三部分：采用桥接研究，评价试验体外诊断试剂对于特泊替尼药物的伴随诊断性能。

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。试验结果显示：试验用体外诊断试剂与 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%)，总符合率为 98.6% (95%CI: 96.9%~99.5%)。

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药物的伴随诊断性能。

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，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%)，总符合率为 100% (95%CI: 98.3%~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。

### 【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/ $\mu$ L，提取的DNA浓度低于2 ng/ $\mu$ L，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. 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。
11. 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。
12. 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。
13. 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。
14. 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》。
15. 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]Perner, S., P. L. Wagner, et al. (2008). Neoplasia 10(3): 298-302.
- [3]Kwak, E. L., Y. J. Bang, et al. (2010). N Engl J Med 363(18): 1693-1703.
- [4]Paik, J. H., G. Choe, et al. (2011). J Thorac Oncol 6(3): 466-472.
- [5]Rodig, S. J., M. Mino-Kenudson, et al. (2009). Clin Cancer Res 15(16): 5216-5223.
- [6]Takeuchi, K., M. Soda, et al. (2012). Nat Med 18(3): 378-381.
- [7]Bergethon, K., A. T. Shaw, et al. (2012). J Clin Oncol 30(8): 863-870.
- [8]Liu, S. Y., L. Y. Gou, et al. (2016). J Thorac Oncol 11(9): 1503-1510.
- [9]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

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

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	<i>EGFR</i> 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_2247del19	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%