

受理号：CSZ2100196

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人类 IDH1 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：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.....	5
三、临床评价概述.....	9
四、产品受益风险判定.....	11
综合评价意见.....	13

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

本试剂盒含有IDH PCR反应条、IDH 混合酶、IDH 阳性对照，详见表1、表2。

表 1 试剂盒组成

名称	主要组分	数量
IDH PCR 反应条	引物、探针、镁离子、dNTPs	12 条
IDH 混合酶	Taq DNA 聚合酶、UNG 酶	45 μ L
IDH 阳性对照	质粒 DNA、野生型 DNA	250 μ L

表 2 IDH PCR 反应条的组成

管号	检测试剂	体积	荧光信号	检测区段	碱基变化
1	IDH 反应液 1	35 μ L	FAM, VIC	IDH1 外显子4	394C>A, 395G>A
2	IDH 反应液 2	35 μ L	FAM, VIC	IDH1 外显子4	394C>T, 395G>T
3	IDH 反应液 3	35 μ L	FAM, VIC	IDH1 外显子 4	394C>G
8	IDH外控反应液	35 μ L	FAM	IDH2 外显子3	/

备注：不同批次试剂不可混用。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定性检测急性髓系白血病（AML）患者骨髓样本 DNA 中人类异柠檬酸脱氢酶 1（IDH1）突变基因，检测的突变位

点为：394C>A、395G>A、394C>T、395G>T 和 394C>G，用于艾伏尼布片（Tibsovo 片）的伴随诊断。

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、治疗反应及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

（三）产品包装规格

8 测试/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒基于扩增阻碍突变系统和荧光 PCR 技术实现骨髓样本 DNA 中 IDH1 基因突变的检测。

本试剂盒针对 IDH1 基因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 IDH1 基因突变的检测。

本试剂盒基于荧光 PCR 技术，通过 FAM 标记的荧光探针，在 1~3 号管实现 IDH1 基因突变的实时检测，在 8 号外控管实现 IDH2 基因外显子 3 区段的检测，用于监控样本质量；另外，反应体系中还包含检测人类 IDH1 基因保守区域（IDH1 基因外显子 6 区段）的引物和 HEX 标记的荧光探针，作为内控试剂用于结果判读及监控样本的质量。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

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

自行设计的引物和探针委托专业的合成公司合成，并经 HPLC 纯化获得；DNA 聚合酶、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经检验合格。

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，参考品均采用临床样本制备而成。阳性参考品共 13 支，包括不同突变比例下试剂盒可检出的所有突变类型。阴性参考品共 9 支，7 支为野生型人基因组 DNA，另外含 1 例非人基因组样本和 1 例试剂盒检测范围外的 IDH1 基因突变阳性细胞系样本。检测限参考品共 5 支，包括试剂盒可检出的所有突变类型。精密度参考品共 5 支，包括阴性精密度参考品、不同突变比例所有突变类型的阳性精密度参考品。产品设置了阳性对照（PC）和阴性对照（NTC，自备纯化水），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、靶基因和内外控引物及探针浓度的研究、PCR 扩增反应条件的研究和循环数研究等。

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

本产品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临床样本、弱阳性和中阳性临床样本进行检测，评价本产品批内、批间及检测日内、日间、操作者间精密度，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，本试剂盒在 10ng 基因组 DNA 背景下，能够检出 1% 的基因突变。

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、具有一定同源性的其他常见突变类型及 AML 其他常见基因突变类型（包括试剂盒涵盖范围外的 IDH1 基因 1 种突变类型，IDH2 基因 11 种突变类型，FLT3、NRAS、NPM1 和 JAK2 基因各 1 种突变类型）、野生型基因序列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（葡萄糖（1.2g/L）、柠檬酸钠（0.645mol/L）、EDTA（27 μmol/L））、内源性干扰物质（血红蛋白（3g/L）、甘油三酯（37mmol/L）、白蛋白（60g/L）、胆红素（342 μmol/L））和药物阿糖胞苷（60 μg/mL）对检测结果无影响，肝素钠（终浓度 150U/mL）对检测结果有一定抑制作用。

申请人采用临床样本进行了核酸提取试剂盒性能的研究，根据与该产品的组合性能研究结果，确定推荐的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 210 例 AML 骨髓样本，分别统计 FAM 通道 Ct 值和 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，再用另外一批 51 例临床样本上对阳性判断值进行验证。另外对 1121 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 4。

表 4 结果判定

8联管编号		1	2	3
阳性A区	突变Ct值	Ct <24	Ct <26	Ct <26
阳性B区	突变Ct值	24 ≤ Ct < 26	26 ≤ Ct < 28	26 ≤ Ct < 28
	ΔCt Cut-off值	8	9	9
阴性	突变Ct值	Ct ≥ 26	Ct ≥ 28	Ct ≥ 28

当样品突变 Ct 值大于或等于阴性临界 Ct 值时（即落于阴性区），则该样品为阴性或低于本试剂盒的检测下限。当样品突变 Ct 值小于阴性临界值时，进行如下判断：当某个反应管的突变 Ct 值小于阳性临界值时（即落于阳性 A 区），则该样品为该反应管对应的突变阳性，即

阳性 A 区；当反应管的突变 Ct 值大于阳性临界值时，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（突变 Ct 值-外控 Ct 值），若反应管的 ΔCt 值小于相对应的 $\Delta Ct_{\text{Cut-off}}$ 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。

（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 0、6、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

申请人提交了试验体外诊断试剂的临床检测性能和伴随诊断意义的临床试验资料，分为如下两部分。

（一）临床检测性能

本产品在北京协和医科大学附属协和医院、浙江大学医学院附属第一医院和苏州大学附属第一医院 3 家临床试验机构进行临床试验，采用试验体外诊断试剂与 sanger 测序进行比较研究，确认本产品的临床检

测性能。入组病例为急性髓性白血病（AML）患者，样本类型为骨髓样本，共纳入 1121 个病例，其中阳性样本 140 例，阴性样本 981 例。

试验结果显示：试验体外诊断试剂与 sanger 测序的阳性符合率为 100%（95%CI: 97.2%，100.00%），阴性符合率为 99.1%（95%CI: 98.3%，99.5%），总符合率为 99.2%（95%CI: 98.5%，99.6%）。

（二）伴随诊断意义

试验体外诊断试剂的伴随诊断证据采用桥接试验的路径提交，桥接样本来自伴随药物艾伏尼布片的关键性药物临床试验（AG120-C-001 和 CS3010-101）入组人群的样本。

1.与药物临床试验入组人群筛选试剂 CTA 检测结果的一致性

该部分研究的样本共纳入 158 例样本，试验体外诊断试剂与 CTA 的阳性符合率为 92.9%（95%CI: 87.1%；96.2%），阴性符合率为 100%（95%CI: 88.9%，100%），总符合率为 94.3%（95%CI: 89.5% ~ 96.9%）。

2.试验体外诊断试剂的桥接药物疗效

针对药物关键性临床试验纳入的 204 例 IDH1 基因突变阳性的骨髓样本，本次桥接试验纳入 118 例，试验体外诊断试剂检测阳性的 110 例。针对药物关键性临床试验中的主要评价指标，上述 110 个病例的 CR+CRh 率为 31.8%（95%CI: 23.3% ~ 41.4%），与药物关键性临床试验结果基本一致；对于药物关键性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 110 个病例的次要评价指标结果也与药物关键性临床试验中的结果基本一致；同时，针对需要进行敏感性分析的情况也进行了充分分析。

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

本产品用于艾伏尼布片的伴随诊断，为临床医生对急性髓系白血病（AML）患者选择靶向药物提供依据。检测结果仅供临床参考，具体临床应用时，临床医生必须结合病例实际情况进行综合判断。

本产品临床应用的主要受益在于：作为艾伏尼布片的伴随诊断试剂对靶向用药人群进行筛选，便于IDH1突变检测阳性的AML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.本试剂盒用于体外定性检测急性髓系白血病（AML）患者骨髓样本DNA中人类异柠檬酸脱氢酶1（IDH1）突变基因，检测的突变

位点为：394C>A、395G>A、394C>T、395G>T和394C>G，用于艾伏尼布片（Tibsovo片）的伴随诊断。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、治疗反应及其他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。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令 第 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，经系统评价后，建议准予注册。

2024 年 10 月 22 日

附件：产品说明书

人类 *IDH1* 基因突变检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【产品名称】

通用名称：人类 *IDH1* 基因突变检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

8 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测急性髓系白血病（AML）患者骨髓样本 DNA 中人类异柠檬酸脱氢酶 1 (*IDH1*) 突变基因，检测的突变位点为：394C>A、395G>A、394C>T、395G>T 和 394C>G，用于艾伏尼布片（Tibsovo 片）的伴随诊断。

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、治疗反应及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

IDH1 基因位于人类 2 号染色体长臂 2q33.3，含 10 个外显子，该基因编码的 *IDH1* 蛋白位于胞浆和过氧化物酶体内，是三羧酸循环中的一种重要催化酶，主要是将细胞质中的异柠檬酸氧化脱羧生成 α -酮戊二酸 (α -KG)，参与三羧酸循环氧化供能，是多种代谢途径所需的非线粒体还原型烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 的主要来源^[1]。近年来研究发现，不同 AML 人群的 *IDH* 基因突变频率存在差异，成人 *IDH1* 突变频率在 4.3%~33%^[2-4]，儿童 *IDH1* 突变频率在 1.3~1.7%^[5-6]。研究表明，*IDH1* 基因突变的复发或难治性 AML 患者可以从 *IDH1* 抑制剂药物治疗中获益^[7-8]。因此对 *IDH1* 基因突变的检测可以指导患者治疗，为临床医生用药和预后评估提供依据。

【检验原理】

本试剂盒基于扩增阻碍突变系统和荧光 PCR 技术实现骨髓样本 DNA 中 *IDH1* 基因突变的检测。

本试剂盒针对 *IDH1* 基因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 *IDH1* 基因突变的检测。本试剂盒同时结合荧光 PCR 技术，通过 FAM 标记的荧光探针，在 1~3 号管实现 *IDH1* 基因突变的实时检测，在 8 号外控管实现 *IDH2* 基因外显子 3 区段的检测，用于监控样本质量；另外，反应体系中还包含检测人类 *IDH1* 基因保守区域（*IDH1* 基因外显子 6 区段）的引物和 HEX 标记的荧光探针，作为内控试剂用于结果判读及监控样本的质量。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。

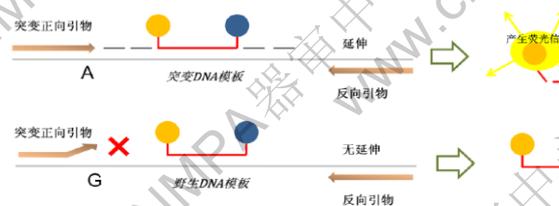


图 1 试剂盒的作用原理

【主要组成成分】

试剂盒采用 8 联 PCR 管设计，每一个 8 联 PCR 管检测一个样品，8 联管的 1~3 号（8 联 PCR 管一端为平端，另一端为梯形端，平端为 1 号管，梯形端为 8 号管）管内装有相应的 *IDH1* 基因 5 种突变检测和内控试剂，突

变由 FAM 信号指示，内控由 VIC 信号指示；8 号管作为 DNA 提取质量的外控检测管，亦由 FAM 信号指示，内控和外控作为对试剂、DNA 质量以及操作本身的质控，选择的检测区域是人类 *IDH1* 或 *IDH2* 基因相对保守的区段，约 100bp，这样即便 DNA 有降解，外控和内控仍然能够最真实地反应基因有效的 DNA 量。（详见表 1 和表 2）

表 1 试剂盒组成

名称	主要组分	数量
IDH PCR反应条	引物、探针、镁离子、dNTPs	12条
IDH 混合酶	Taq DNA聚合酶、UNG酶	45 μL
IDH 阳性对照	质粒DNA、野生型DNA	250 μL

表 2 IDH PCR 反应条的组成

管号	检测试剂	体积	荧光信号	检测区段	碱基变化
1	IDH 反应液 1	35 μL	FAM, VIC	<i>IDH1</i> 外显子4	394C>A, 395G>A
2	IDH 反应液 2	35 μL	FAM, VIC	<i>IDH1</i> 外显子4	394C>T, 395G>T
3	IDH 反应液 3	35 μL	FAM, VIC	<i>IDH1</i> 外显子 4	394C>G
8	IDH外控反应液	35 μL	FAM	<i>IDH2</i> 外显子3	/

备注：不同批次试剂不可混用。

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：新鲜血液/骨髓 DNA；医疗器械备案号：闽厦械备 20150078 号）。
2. 无 DNase 和 RNase 移液器滤芯吸嘴。
3. 无 DNase 和 RNase 的纯化水。

【储存条件及有效期】

避光储藏在 $-20\pm 5^{\circ}\text{C}$ 。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，需要泡沫箱加冰袋密封运输，运输时间不超过一周，运输温度不高于 30°C 。

生产日期及有效期至见标签。

【适用仪器】

全自动医用 PCR 分析系统（型号：SLAN-96S）。

注意：

1. 使用全自动医用 PCR 分析系统（型号：SLAN-96S）仪器时，探针模式设置为 FAM 和 VIC。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。
2. 建议 PCR 仪器在使用过程中应至少每年校准一次。

【样本要求】

1. 骨髓样本一般不少于 $200\ \mu\text{L}$ ，推荐使用 EDTA 抗凝剂。
2. 骨髓样本保存条件：采集完成后若不立即进行 DNA 提取，可在 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 或 -15°C 以下保存， $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 保存时间不超过 7 天， -15°C 以下保存时间不超过 3 年。
3. 骨髓样本运输条件： $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 恒温运输或者泡沫箱加冰袋密封运输，运输时间不超过一周，运输温度不高于 25°C 。

4. DNA 分离完毕后，建议使用紫外分光光度计测定 DNA 浓度，DNA 浓度应大于 2 ng/μL，建议 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 介于 1.7~2.0 之间。
5. DNA 提取完毕后，建议立即进行检测，检测前请对核酸进行准确定量，并将样品 DNA 使用 1×TE (pH8.0) 稀释至 2ng/μL，DNA 上样浓度超过 3ng/μL 可能会导致检测结果不准确。
6. DNA 提取完毕后，若不立即进行检测，请勿将 DNA 进行浓度稀释，直接放置于-20±5℃ 保存，保存时间不要超过 6 个月。

【检验方法】

在每次PCR反应中，每份样品必须和阳性对照（PC）、阴性对照（NTC，自备纯化水）共同进行检测和分析。

1. 按核酸提取试剂说明书对骨髓样本进行核酸提取，并根据提取后的定量浓度将核酸调整至上样浓度，阴性对照应平行参与核酸提取过程。
2. 取出 **IDH 阳性对照**和 **IDH 混合酶**。阳性对照解冻后，振荡混匀。**IDH 阳性对照**和 **IDH 混合酶**需快速离心 15 秒待用。
3. 分别向体积均为 42.3 μL 的待测样品 DNA、**IDH 阳性对照**（PC）和纯化水（NTC）中加入 2.7 μL **IDH 混合酶**，涡旋器上混匀 15 秒，然后快速离心 15 秒。推荐 DNA 样本上样浓度为 2ng/μL，客户可根据实际情况对 DNA 上样量做适当的调整。
4. 将 **IDH PCR 反应条**放置于在 PCR 管冰架上，轻轻揭开管盖。如发现管盖内侧有液滴，开盖前请先离心。
5. 将混好的 DNA 样品依次取 5 μL 靠着 PCR 管上管壁加入 **IDH PCR 反应条**

的 1~3 号管和 8 号管中，然后小心盖上 IDH PCR 反应条的管盖。PC 和 NTC 操作同上。

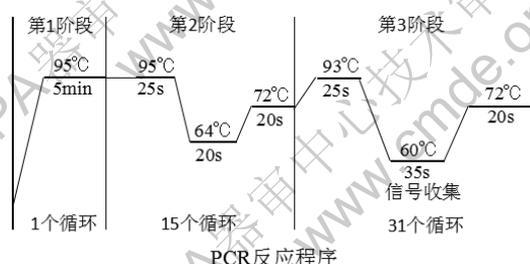
6. 快速离心 IDH PCR 反应条 15 秒。

7. 将 IDH PCR 反应条平行放入实时 PCR 仪器。请勿将 PCR 反应条方向颠倒。PCR 反应板布局见表 3 中推荐方法。

表 3 PCR 反应板推荐布局

管号	A	B	C	D	E	F
1	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	PC	NTC
2	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	PC	NTC
3	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	PC	NTC
4	/	/	/	/	/	/
5	/	/	/	/	/	/
6	/	/	/	/	/	/
7	/	/	/	/	/	/
8	样品 1	样品 2	样品 3	样品 4	PC	NTC

8. 打开仪器窗口，按照下图中说明的扩增程序图进行设置。



注意：加好样品的PCR反应条应立即上机实验。

第一阶段：95℃ 5分钟，1个循环；

第二阶段：95℃ 25秒，64℃ 20秒，72℃ 20秒，15个循环；

第三阶段：93℃ 25秒，60℃ 35秒，72℃ 20秒，31个循环；

信号收集：第三阶段60℃时收集FAM和VIC信号，运行实时PCR，保存文件。

9. 实验结束后，使用 2 层 PE 手套包扎好 PCR 反应条，并按生物垃圾处理。

严禁打开 PCR 管盖，以防造成污染。

【阳性判断值】

1. Ct值的确定：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进行分析，同时选择阳性对照反应管、样本反应管和阴性对照反应管，以阳性对照扩增曲线升起的拐点处为阈值线，得到各反应管的Ct值。

2. 突变结果的确定：首先确定样品各个反应管各自的突变Ct值，然后确定该样品的外控反应管Ct值。由于样品中突变百分含量各不相同，所得到的突变Ct值也各不相同。具体判定见表4。

a) 当样品突变Ct值大于或等于阴性临界Ct值时（即落于阴性区），则该样品为阴性或低于本试剂盒的检测下限。

b) 当样品突变Ct值小于阴性临界值时，进行下列判断：

i. 当某个反应管的突变Ct值小于阳性临界值时（即落于阳性A区），则该样品为该反应管对应的突变阳性，即阳性A区。

ii. 当反应管的突变Ct值大于阳性临界值时，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。

3. ΔCt 值的计算： ΔCt 值=突变Ct值-外控Ct值。突变Ct值是指样品突变信号（FAM信号）对应的Ct值；外控Ct值是指样品对应的外控信号（FAM信号）的Ct值。

4. 某些阳性A区样品可能会导致个别突变反应管之间出现交叉信号。当样品在2个或2个以上反应管出现阳性结果（按照表4判读）时，先确定突变反应管中Ct值最小的为真阳性，再计算各反应管的 ΔCt 值（突变Ct值-外控Ct值），并

按照表5所列交叉信号阈值来判定其它反应管是否为交叉信号。

- i.若 ΔCt 值小于交叉信号阈值，则认为真是阳性信号，可判为该突变反应管阳性；
- ii.若 ΔCt 值大于或等于交叉阈值，则认为交叉信号，可判为该突变反应管阴性。

表 4 结果判定

8联管编号		1	2	3
阳性A区	突变Ct值	$Ct < 24$	$Ct < 26$	$Ct < 26$
阳性B区	突变Ct值	$24 \leq Ct < 26$	$26 \leq Ct < 28$	$26 \leq Ct < 28$
	ΔCt Cut-off值	8	9	9
阴性	突变Ct值	$Ct \geq 26$	$Ct \geq 28$	$Ct \geq 28$

表 5 交叉反应阈值表*

真阳性 DNA	交叉反应管的阈值		
	1号管	2号管	3号管
1号管	-	-	9.13
2号管	-	-	-
3号管	5.06	-	-

备注：“-”表示无交叉反应。

“*”根据人工合成质粒的实验数据获得。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照(NTC)的1~3号管的FAM信号应无明显扩增曲线。若1~3号管其中任一管FAM信号升起，则此次实验结果无效，应重新检测。若1~3号管的VIC信号及8号管的FAM信号偶尔升起，而1~3号管的FAM信号无扩增曲线，不影响对突变检测结果的判断，可继续进行分析。
- 2.阳性对照(PC)的FAM和VIC信号均应有明显的扩增曲线，Ct值一般小于20。
- 3.样本8号反应管（外控反应管）的FAM信号应有明显扩增曲线，且Ct值应在12~19之间。

① 若8号管Ct \leq 12，说明加入的DNA过量，应减少DNA加入量再进行试验；此种情况下，若1~3号管FAM信号无明显扩增曲线或Ct落在阴性区，该样本无需重复检测，检测结果为*IDH1*基因突变阴性。

② 若8号管Ct $>$ 19或FAM信号无明显扩增，说明加入的DNA含有PCR抑制剂或DNA加入量过少，需要重新提取DNA或增加DNA上样量再进行试验；此种情况下，若1~3号管FAM信号有明显的扩增曲线，且Ct小于阳性临界值，该样本无需重复检测，检测结果为*IDH1*基因突变阳性。

4.待测样品1~3号管内控VIC信号应有明显的扩增曲线且Ct值小于31。若1~3号管内控无明显的扩增曲线，说明加入的DNA含有PCR抑制剂或DNA加入量不够，需要重新提取DNA后再进行试验；此种情况下，若1~3号管FAM信号有明显的扩增曲线，可能是由于该反应管突变序列的扩增抑制了内控序列的扩增，可继续进行分析。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个性化治疗选择应结合其症状、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*IDH1*基因突变的存在，样本中肿瘤DNA过少、严重降解或扩增反应体系中DNA突变浓度低于检测下限亦可造成阴性结果。
3. 不合理的样本采集、转运及处理、以及不当的试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. 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）。
5. *IDH1*基因突变检测结果阳性对临床用药的指导，应结合临床个体化用药研究

进展综合进行评价。

6. 本检测试剂不适用*IDH1*基因拷贝数表达量的检测。

【产品性能指标】

1. 准确度研究中，使用3批成品试剂盒在适用机型上对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%。
2. 精密度研究中使用3批成品试剂盒在适用机型上对阴性临床样本和弱阳性和中阳性临床样本进行检测，评价本试剂盒批内、批间及检测日内、日间、操作者间精密度，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%。
3. 最低检测限研究中，使用不同核酸浓度和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，本试剂盒在10ng基因组DNA背景下，能够检出1%的基因突变。
4. 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、具有一定同源性的其他常见突变类型及AML其他常见基因突变类型（包括试剂盒涵盖范围外的*IDH1*基因1种突变类型，*IDH2*基因11种突变类型，*FLT3*、*NRAS*、*NPM1*和*JAK2*基因各1种突变类型），野生型基因序列和非人类基因组基因。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（葡萄糖（1.2g/L）、柠檬酸钠（0.645mol/L）、EDTA（27μmol/L））、内源性干扰物质（血红蛋白（3g/L）、甘油三酯（37mmol/L）、白蛋白（60g/L）、胆红素（342μmol/L））和药物阿糖胞苷（60μg/mL）对检测结果无影响，肝素钠（终浓度150U/mL）

对检测结果有一定抑制作用。

5. 采用临床样本进行了核酸提取试剂盒性能的研究，根据与本试剂盒的组合性能研究结果，确定推荐的核酸提取试剂符合检测需求。

6. 临床评价结果：

本产品在三家临床试验机构进行临床试验，采用试验体外诊断试剂与sanger测序进行比较研究，共纳入1121个病例，本产品与sanger测序的阳性符合率为100%，阴性符合率为99.1%，总符合率为99.2%。

本产品的伴随诊断证据通过桥接试验的路径进行确认，桥接样本来自艾伏尼布片的关键性药物临床试验入组人群的样本。针对本产品与药物临床试验入组人群筛选试剂CTA检测结果的一致性研究，共纳入158例样本，本产品与CTA的阳性符合率为92.9%，阴性符合率为100%，总符合率为94.3%。针对本产品的桥接药物疗效，本产品检测阳性病例的主要评价指标CR+CRh率和其他次要评价指标均与药物临床试验结果基本一致。

【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品本身的来源、样品采集过程、样本质量、样本运输条件、样本预处理等因素影响，同时也受到DNA提取质量、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. 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。

5. 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。
6. 实验时注意防止外源DNA对试剂的污染，注意先加完样品DNA后再进行阳性对照的操作。推荐在制备反应试剂和添加DNA模板时，使用单独、专用的移液枪和滤芯吸嘴。进行反应试剂制备的地点应当与添加模板的地点相隔离。
7. 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。
8. 所有化学药品都具有潜在的危险性。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。
9. 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》。
10. 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。

【参考文献】

1. Lee S M , Koh H J , Park D C , et al. Cytosolic NADP+-dependent isocitrate dehydrogenase status modulates oxidative damage to cells[J]. Free Radical Biology and Medicine, 2002, 32(11):1185-1196.
2. Recurring Mutations Found by Sequencing an Acute Myeloid Leukemia

Genome[J]. New England Journal of Medicine, 2009, 361(11):1058-1066.

3. Wen-Chien C , Hsin-An H , Chien-Yuan C , et al. Distinct clinical and biologic characteristics in adult acute myeloid leukemia bearing the isocitrate dehydrogenase 1 mutation.[J]. Blood, 2010, 115(14):2749-2754.

4. Schnittger S , Haferlach C , Ulke M , et al. IDH1 mutations are detected in 6.6% of 1414 AML patients and are associated with intermediate risk karyotype and unfavorable prognosis in adults younger than 60 years and unmutated NPM1 status.[J]. Blood, 2010, 116(25):5486-5496.

5. Patel K P , Farhad R , Deqin M , et al. Acute myeloid leukemia with IDH1 or IDH2 mutation: frequency and clinicopathologic features.[J].American Journal of Clinical Pathology, 2011, 135(1):35-45.

6. Andersson A K , Miller D W , Lynch J A , et al. IDH1 and IDH2 mutations in pediatric acute leukemia[J]. Leukemia, 2011, 25(10):1570-1577.

7. Dinardo C D , Stein E M , Stéphane de Botton, et al. Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1-Mutated Relapsed or Refractory AML[J].New England Journal of Medicine, 2018, 378(25).

8. James D , Daniel P . Enasidenib for the treatment of acute myeloid leukemia [J].Expert Review of Clinical Pharmacology, 2018:17512433.2018.1477585.

【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

邮编：

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 试剂盒涵盖热点突变信息

管号	反应液	检测区段	突变名称	碱基变化	Cosmic ID	公司命名	检测限
1	IDH 反应液 1	IDH1 外显子 4	R132S	394C>A	28748	IDH1-M1	1%
			R132H	395G>A	28746	IDH1-M4	1%
2	IDH 反应液 2	IDH1 外显子 4	R132C	394C>T	28747	IDH1-M2	1%
			R132L	395G>T	28750	IDH1-M5	1%
3	IDH 反应液 3	IDH1 外显子 4	R132G	394C>G	28749	IDH1-M3	1%