

受理号：CSZ1800026

体外诊断试剂产品注册 技术审评报告

产品中文名称：EGFR/ALK/ROS1/BRAF/KRAS/HER2 基因突变

检测试剂盒（可逆末端终止测序法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：南京世和医疗器械有限公司

国家食品药品监督管理总局

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
产品审评摘要	4
一、 产品概述	4
二、 临床前研究摘要	6
三、 临床评价摘要	13
四、 风险分析及说明书提示	20
综合评价意见	24

基本信息

一、申请人名称

南京世和医疗器械有限公司

二、申请人住所

南京市高新开发区新锦湖路 3 号-1 中丹产业园 A-7 楼

三、生产地址

南京高新技术产业开发区新锦湖路 3 号-1 中丹生态生命科学产业园一期 A 栋 7 楼 701、708-712, B 栋 18 层

产品审评摘要

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

表 1 试剂盒主要组成成分

组分	缩写	管盖颜色	规格及数量	
			12人份/盒	48人份/盒
修复缓冲液	B1	黄色	84 μL *1管	350 μL *1管
修复反应液	E1	黄色	36 μL *1管	150 μL *1管
接头1-24	A01-A24	绿色	5 μL *24管	11 μL *24管
连接酶	E2	绿色	120 μL *1管	490 μL *1管
连接缓冲液	B2	绿色	360 μL *1管	1470 μL *1管
PCR扩增反应液	E3	粉色	480 μL *1管	1500 μL *1管
PCR扩增引物	P1	粉色	96 μL *1管	290 μL *1管
富集探针	P2	红色	7.5 μL *1管	11 μL *1管
DNA封闭液	B3	红色	15 μL *1管	21 μL *1管
封闭序列	S1	红色	6 μL *1管	9 μL *1管
杂交缓冲液1	B4	红色	22.5 μL *1管	32 μL *1管
杂交缓冲液2	B5	红色	9 μL *1管	13 μL *1管
清洗缓冲液1	W1	白色	90 μL *1管	128 μL *1管
清洗缓冲液2	W2	白色	60 μL *1管	85 μL *1管
清洗缓冲液3	W3	白色	60 μL *1管	85 μL *1管
清洗缓冲液4	W4	白色	120 μL *1管	170 μL *1管
磁珠清洗液	BW	白色	600 μL *1管	840 μL *1管
阴性对照品	NC	蓝色	150 μL *1管	200 μL *1管
阳性对照品	PC	蓝色	150 μL *1管	200 μL *1管
磁珠	MB	白色	300 μL *1管	425 μL *1管

试剂盒具体组成成分及配套试剂及软件见说明书。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中 EGFR、ALK、ROS1、BRAF、KRAS、HER2 基因的多种变异。其中，EGFR

基因 19 外显子缺失及 L858R 点突变用于吉非替尼片及盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测，T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测；ALK 基因融合和 ROS1 基因融合用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测（具体可参考表 2）。

表 2 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	基因及变异类型
吉非替尼片	EGFR: 19外显子缺失、L858R
盐酸埃克替尼片	EGFR: 19外显子缺失、L858R
甲磺酸奥希替尼片	EGFR: T790M
克唑替尼胶囊	ALK融合、ROS1融合

表 3 中为本试剂盒可以检出，但未经伴随诊断验证的基因突变类型。

表 3 未经伴随诊断验证的基因突变类型

基因名称	突变类型
EGFR	G719位点突变、L861Q
BRAF	V600E
KRAS	G12位点突变、G13位点突变
HER2	20外显子插入突变

其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

12 人份/盒；48 人份/盒。

（四）产品检验原理

该试剂盒采用 DNA 探针捕获技术，首先对从 NSCLC 肿

瘤 FFPE 样本中提取的核酸（DNA）进行片段化、加接头、PCR 扩增等步骤制备文库，其后采用具有特定序列的 DNA 探针与文库进行杂交，从而特异性捕获来自人类基因组 6 种基因中的部分外显子与内含子区域，之后通过磁珠法富集被探针捕获的目标区域 DNA 片段。再对捕获富集后的文库进行定量与质控后，采用基因测序仪（型号：MiSeqDx，Illumina 公司生产）进行高通量测序。对于测序数据，采用生物信息学软件判读 6 种基因中是否存在来自肿瘤的变异。

二、临床前研究摘要

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

该产品的主要原材料包括：寡核苷酸接头、通用 PCR 扩增引物、富集探针、链霉亲和素磁珠、阴性对照品、阳性对照品等，这些原材料均为外购方式获得，其中富集探针为申请人自行设计后由专业的合成公司合成。申请人选择了 2-3 家有资质的供应商提供的原料，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. 企业参考品和对照品设置情况：

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。所有参考品均经过已上市试剂盒

/Sanger 测序方法和/或其他平台 NGS 法验证,其中:

阳性参考品 9 份, 为相关基因变异阳性的临床样本, 涵盖了该产品可检出的所有基因变异类型。

阴性参考品 1 份, 为 EGFR /ALK /ROS1 /BRAF /KRAS /HER2 基因变异阴性的汉族健康人白细胞 DNA 样本。

最低检测限参考品为阳性参考品在相关检测项目进行前以阴性参考品稀释获得, 涵盖了该产品可检出的所有基因变异类型。其中 EGFR /ROS1 /BRAF /KRAS /HER2 基因突变比例为 1% 和 ALK 基因融合比例为 2.5%。

精密度参考品 4 份, 为相关基因变异阳性的临床样本, 突变比例为 15~30%。

该产品设置了阴性对照品及阳性对照品。其中, 阴性对照品为汉族健康人白细胞 DNA, 阳性对照品由相关基因变异阳性质粒混合汉族健康人白细胞 DNA 制备, 涵盖各基因的代表性变异类型, 具体为 EGFR 基因 L858R 点突变、ALK 基因融合、ROS1 基因融合、BRAF 基因 V600E 突变、KRAS 基因 G12C 点突变及 HER2 基因 20 外显子插入, 用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过使用初步确定的配方进行反应体系配制, 对反应体系中的样本核酸提取试剂、样本 DNA 用量、DNA 聚合酶用量、聚核苷酸激酶用量、DNA 连接酶用量、Mg²⁺离

子浓度、dNTP 用量、接头用量、扩增引物浓度、PCR 反应体系、杂交探针用量、寡核苷酸序列用量等进行筛选和优化，通过临床样本进行功能性试验，最终确定了最佳的生产工艺和反应体系。

（三）分析性能评估

分析性能评估内容包括阴/阳性参考品符合率、分析灵敏度（最低检测限）、精密度（重复性）评估、分析特异性（交叉反应和干扰因素）、核酸提取纯化配套试剂组合性能研究、肿瘤组织细胞含量研究等。

在阴/阳性参考品符合率实验中，采用阳性参考品及阴性参考品在 3 批成品试剂盒（批号：20140715、20140720、20140725）分别评价了试剂盒的阳性参考品符合率和阴性参考品符合率，符合率均为 100%。同时选取 21 个阳性临床样本和 5 个阴性临床样本（所有样本的基因变异类型均经已上市试剂盒/Sanger 测序方法和/或其他平台 NGS 法验证）在 3 批成品试剂盒（批号：18040801、18041101 和 18041401）上分别进行检测，结果均能正确检出。

在分析灵敏度（最低检测限）实验中，申请人选择带有已知突变的临床样本和无突变的临床阴性样本（均经已上市试剂盒/Sanger 测序方法和/或其他平台 NGS 法验证），根据样本的原始突变比例，按照不同比例进行稀释，通过 3 批试剂盒（批号：18040801、18041101 和 18041401），每种突变

类型设 20 次重复检测，评估了每种突变比例的检测情况，最终确定：EGFR 基因 G719 位点、T790M、L858R 及 19 外显子缺失、ROS1 基因融合、BRAF 基因 V600E、KRAS 基因 G12 及 G13 位点和 HER2 基因 20 外显子插入，不低于 95% 检出率的最低检测限均为 1%；ALK 基因融合的最低检测限为 2.5%。用 3 批成品检测试剂盒（批号：20140715、20140720、20140725）进行检测限参考品的检测，每种突变类型设 20 次重复检测，结果均能正确检出。

在精密度（重复性）研究中，申请人采用精密度参考品在 3 批成品试剂盒（批号：20140715、20140720、20140725）上分别完成 10 次重复检测，检测结果一致。同时在不同突变比例的临床样本中验证了精密度（均经已上市试剂盒/Sanger 测序方法和/或其他平台 NGS 法验证），选取阴性临床样本、弱阳性临床样本（2% -5% 突变比例）和中阳性临床样本（24% -30% 突变比例），每个样本重复检测 12 次，在 3 批成品试剂盒（批号：18040801、18041101 和 18041401）上分别完整评价了本产品的批内、批间及检测日内、日间和操作者间精密度，检测结果一致，表明试剂盒精密度良好。

分析特异性实验涵盖交叉反应研究及干扰因素研究。所用临床样本包括 EGFR 基因 15 种其他突变类型、BRAF 基因 2 种其他突变类型、KRAS 基因 4 种其他突变类型、HER2 基因 6 种其他突变类型、MET 基因 1 种突变类型、PIK3CA

基因 1 种突变类型、以及含有结核分枝杆菌/肺炎链球菌/铜绿假单胞菌 DNA 的样本，经验证，上述样本与本产品均不产生交叉反应。干扰因素研究结果显示，临床 FFPE 样本可能存在的干扰物（酒精、福尔马林、石蜡、血红蛋白等，浓度分别为 1%V/V、0.005%V/V、1%V/V、2g/L）均不干扰本试剂盒的检测结果。

针对核酸（DNA）提取纯化步骤，申请人采用临床样本，平行比较了 2 种核酸提取试剂盒的产量、纯度及 DNA 片段大小等各方面性能，根据与该产品的组合性能研究结果，确定了 1 种核酸提取试剂作为样本提取的推荐试剂盒。

在肿瘤组织细胞含量研究中，申请人对不同肿瘤细胞占比对检测结果的影响进行了研究。结果表明，肿瘤细胞占比 10% 以上的组织样本均可检出。结合临床样本的多样性和复杂性，建议组织样本肿瘤细胞占比 $\geq 20\%$ 。

（四）阳性判断值

申请人首先采用临床样本评估了各类基因变异的总体阳性判断值，然后对临床试验中收集的大量临床样本进行了每种基因变异的阳性判断值验证，最终确定了配套软件中的阳性判断值标准。

申请人先采用 268 例临床样本（相关基因变异情况均已经由已上市试剂盒/Sanger 测序方法和/或其他平台 NGS 法验证），通过 SPSS 软件对 ROC 曲线进行分析，根据 Youden

指数最大值预估各类变异的总体阳性判断值。然后扩大样本量至 463 个，部分样本采用临床试验中收集的样本，进行每种基因变异的阳性判断值验证，其中包含 EGFR 基因 G719 位点 28 例、19 外显子缺失 51 例、T790M 21 例、L858R 40 例和 L861Q 20 例、KRAS 基因 G12 位点 30 例和 G13 位点 20 例、BRAF 基因 V600E 20 例、HER2 基因 20 外显子插入 21 例、ALK 基因融合 28 例、ROS1 基因融合 21 例，通过 SPSS 软件对 ROC 曲线进行分析，根据 Youden 指数最大值确定其阳性判断值。

通过上述实验，最终确定该产品使用配套软件进行数据分析时的阳性判断值为：突变比例大于等于 0.6%。

（五）稳定性

申请人对该产品实时稳定性、冻融稳定性、运输稳定性进行研究，确定了在各种条件下本产品的有效保存时间。同时，对 FFPE 样本稳定性、核酸（DNA）溶液稳定性、文库稳定性进行了相关研究，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：采用三批次成品试剂盒（批号：20140715、20140720、20140725）储存于 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下（磁珠于 $2\sim 8^{\circ}\text{C}$ 条件下保存），分别在 0 月、3 月、6 月、9 月、10 月、11 月和 12 月对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检测限和重复性等进行考察，各项性能均符合要求，确定产品标

示保存条件为 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ （磁珠于 $2^{\circ}\text{C} \sim 8^{\circ}\text{C}$ ），有效期确定为 10 个月。

冻融稳定性：将三批次成品试剂盒（批号：20140715、20140720、20140725）反复冻融数次，分别在反复冻融第 0、3、4、5、6、7 次后对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检测限和重复性等进行考察，结果均无影响。为保证检测结果的稳定性，推荐使用过程中试剂尽量避免反复冻融，并且冻融次数不超过 4 次。

运输稳定性：将三批次成品试剂盒（批号：20140715、20140720、20140725）按照规定条件分别运往北京和广州再运回生产地址，分别在 0 月、3 月、6 月、9 月、10 月、11 月、12 月时对物理性能、阳性符合率、阴性符合率、检测限和重复性等进行考察，各项性能均符合要求。

申请人对石蜡样本稳定性、核酸（DNA）溶液稳定性、文库稳定性进行了研究。研究结果显示石蜡样本可在 $10^{\circ}\text{C} \sim 30^{\circ}\text{C}$ 条件下保存 3 年以上，核酸（DNA）溶液可在 -20°C 以下保存 14 个月以上，文库溶液可在 -20°C 以下保存 40 天以上。考虑到临床样本多样性，为保证结果稳定性，本产品说明书中规定石蜡样本年限不超过 2 年，提取的 DNA 保存时间不超过 12 个月，文库溶液保存时间不超过 30 天。

三、临床评价摘要

(一) 与已上市试剂或金标准方法的比较研究

申请人在中国医学科学院附属肿瘤医院、南京医科大学第一附属医院(江苏省人民医院)、首都医科大学附属北京胸科医院共 3 家机构完成了本项研究。采用考核试剂与已上市产品或金标准方法比较研究试验的方法,验证本产品的临床性能。入组样本为 960 例非小细胞肺癌样本和 46 例良性组织干扰样本,共计 1006 例有效样本。样本类型为石蜡包埋组织。对比方法选择已上市产品或金标准方法: EGFR 基因 18-21 外显子突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)(注册证号:国械注准 20163401512)、抗 ALK (D5F3) 兔单克隆抗体试剂(注册证号:国食药监械(进)字 2014 第 3403115 号)、人 BRAF 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)(注册证号:国食药监械(准)字 2014 第 3401045 号)、人 KRAS 基因突变检测试剂盒(荧光 PCR 法)(注册证号:国食药监械(准)字 2013 第 3400175 号)、Vysis LSI ROS1 (Cen) SpectrumGreen Probe (Abbott Laboratories) 荧光原位杂交、HER2 基因 20 外显子 Sanger 测序。考核试剂与对比方法结果不一致的样本,采用 Sanger 测序进行序列测定。

本临床试验共检测出 716 例基因变异阳性样本,阳性率为 71.17% (其中 56 例含有大于 1 种基因变异,占阳性样本数的 7.82%),包括 EGFR 基因中 203 例 19 外显子缺失突变

阳性、192例 L858R 突变阳性、41例 T790M 突变阳性、47例 G719 位点突变阳性及 29例 L861Q 突变阳性；ALK 基因中 57例 ALK 基因融合阳性；ROS1 基因中 29例 ROS1 基因融合阳性；BRAF 基因中 25例 V600E 突变阳性；KRAS 基因中 97例 G12 位点突变阳性及 20例 G13 位点突变阳性；HER2 基因中 32例 20 外显子插入突变阳性。

与对比方法的研究结果显示，考核试剂的定性检测结果阳性符合率为 99.29%（95% CI 98.36%-99.70%），阴性符合率为 95.32%（95% CI 92.30%-97.19%），总体符合率为 98.11%（95% CI 97.07%-98.79%），采用 Kappa 一致性检验进行统计学分析，K 值为 0.94，显示考核试剂与对比方法具有很高一致性。

考核试剂与对比方法结果不一致的样本共 19 例，主要分为两方面原因：（1）8 例为考核试剂检测范围超过对比方法（2）11 例可能为不同检测方法间的差异，其中 3 例为考核试剂检测 HER2 20 外显子插入阳性且突变比例已低于 Sanger 测序最低检测限；1 例为对比方法免疫组化检测 ALK 基因融合阳性但无法显示具体融合形式；余下 7 例经 Sanger 测序验证，6 例结果与考核试剂一致，1 例结果与对比方法一致。

（二）与伴随诊断试剂的比较研究

1. EGFR 基因与伴随诊断试剂的比较研究

申请人在中国医学科学院肿瘤医院及首都医科大学北京胸科医院 2 家临床机构开展与已上市或已充分联合药物临床评价的 EGFR 伴随诊断试剂的比较研究。针对 EGFR 基因 19 外显子缺失及 L858R 突变，已上市伴随诊断试剂选用 EGFR 基因突变检测试剂盒(等位基因特异扩增荧光 PCR 法) (国食药监械(进)字 2014 第 3403340 号); 针对 EGFR 基因 T790M 突变，选用 Cobas EGFR Mutation Test V2。

入组样本为比较研究(一)中已入组及部分新入组样本，共入组 323 例 NSCLC FFPE 组织样本。研究结果显示，考核试剂检测 EGFR 基因突变阳性 239 例，包含 19 外显子缺失突变 124 例及 L858R 突变 115 例; 其中 56 例同时检测到 T790M 突变。经统计分析，EGFR 基因 19 外显子缺失的阳性符合率为 100.00% (95% CI 97.00%-100.00%)，阴性符合率为 100.00% (95% CI 98.13% -100.00%)，总体符合率为 100.00% (95% CI 98.84%- 100.00%); L858R 突变的阳性符合率为 100.00% (95% CI 96.77%-100.00%)，阴性符合率为 100.00% (95% CI 98.21%-100.00%)，总体符合率为 100.00% (95% CI 98.84%-100.00%); T790M 突变的阳性符合率为 100.00% (95% CI 93.58%-100.00%)，阴性符合率为 100.00% (95% CI 98.60%-100.00%)，总体符合率为 100.00% (95% CI 98.84%-100.00%)。考核试剂检测 EGFR 基因的阳性符合率为 100.00% (95% CI 98.42%-100.00%)，阴性符合率为 100.00%

(95% CI 95.77%-100.00%), 总体符合率为 100.00% (95% CI 98.84%-100.00%), 采用 Kappa 一致性检验进行统计学分析, K 值为 1, 显示二者具有很高一致性。

2. ALK 基因与伴随诊断试剂的比较研究

对中国医学科学院附属肿瘤医院、南京医科大学第一附属医院 (江苏省人民医院)、首都医科大学附属北京胸科医院共 3 家机构的 (一) 比较研究中入组样本, 均进行已上市的免疫组化法伴随诊断试剂“抗 ALK (D5F3) 兔单克隆抗体试剂 (国食药监械 (进) 字 2014 第 3403115 号)”的检测。

共检测 1006 例 NSCLC FFPE 组织样本。研究结果显示, 考核试剂检测 ALK 基因融合阳性 57 例, 阳性符合率为 99.28% (95% CI 90.86%-99.70%), 阴性符合率为 100.00% (95% CI 99.60%-100.00%), 总体符合率为 99.90% (95% CI 99.44%-99.98%), 采用 Kappa 一致性检验进行统计学分析, K 值为 0.99, 显示二者具有很高一致性。1 例不一致样本为考核试剂检测结果阴性, 伴随诊断试剂阳性。

3. ROS1 基因与伴随诊断试剂的比较研究

在中国医学科学院肿瘤医院及首都医科大学北京胸科医院 2 家临床机构开展。针对 ROS1 基因融合, 选用已充分联合药物临床评价的人类 ROS1 基因融合检测试剂盒 (荧光 PCR 法) (国食药监械 (准) 字 2014 第 3401514 号)。

入组样本为 (一) 比较研究中已入组及部分新入组样本,

共入组 323 例 NSCLC FFPE 组织样本。研究结果显示，考核试剂检测 ROS1 基因融合阳性 37 例，阳性符合率为 100.00% (95% CI 90.60%-100.00%)，阴性符合率为 100.00% (95% CI 98.69%-100.00%)，总体符合率为 100.00% (95% CI 98.84%-100.00%)，采用 Kappa 一致性检验进行统计学分析，K 值为 1，显示二者具有很高一致性。

(三) TKI 药物疗效相关的回顾性临床研究

申请人在“与伴随诊断试剂的比较研究”中已验证为相关基因变异阳性的晚期 NSCLC 病例中，进行了相关靶向药物治疗的回顾性疗效分析研究，共入组有效病例 118 例，其中吉非替尼片 23 例、盐酸埃克替尼片 30 例、甲磺酸奥西替尼片 20 例、克唑替尼胶囊 40 例、盐酸厄洛替尼片 5 例。

申请人对经伴随诊断试剂验证为 EGFR 基因 19 外显子缺失或 L858R 突变阳性的病例中进行了吉非替尼片治疗的回顾性疗效分析，纳入 23 例晚期 NSCLC 有效病例，其中 15 例临床评估部分缓解，7 例评估疾病稳定，1 例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为 65.22% (95% CI 44.89% - 81.19%)、疾病控制率为 95.65% (95% CI 79.01% - 99.23%)，与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者经考核试剂检测结果均为 EGFR 敏感突变 (19 外显子缺失或 L858R) 阳性，与临床既往分子检测结果一致。

申请人对经伴随诊断试剂验证为 EGFR 基因 19 外显子

缺失或 L858R 突变阳性的病例中进行了盐酸埃克替尼片治疗的回顾性疗效分析，纳入 30 例晚期 NSCLC 有效病例，其中 19 例临床评估部分缓解，10 例评估疾病稳定，1 例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为 63.33%（95% CI 45.51% - 78.13%），疾病控制率为 96.67%（95% CI 83.33% - 99.41%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者经考核试剂检测结果均为 EGFR 敏感突变（19 外显子缺失或 L858R）阳性，与临床既往分子检测结果一致。

申请人对经伴随诊断试剂验证为 EGFR 基因 T790M 突变阳性的病例中进行了甲磺酸奥希替尼片治疗的回顾性疗效分析，纳入 20 例晚期 NSCLC 有效病例，其中 14 例床评估部分缓解，4 例评估疾病稳定，2 例评估疾病进展，临床用药客观缓解率为 70.00%（95% CI 48.10% - 85.45%），疾病控制率为 90.00%（95% CI 69.90% - 97.22%），与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者经考核试剂检测结果均为 EGFR T790M 突变阳性，与临床既往分子检测结果一致。

申请人对经伴随诊断试剂验证为 ALK 基因融合阳性的病例中进行了克唑替尼胶囊治疗的回顾性疗效分析，纳入 22 例晚期 NSCLC 有效病例，其中 16 例临床评估部分缓解，6 例评估疾病稳定，临床用药客观缓解率为 72.73%（95% CI 51.85% - 86.85%），疾病控制率为 100.00%（95% CI 85.14%

- 100.00%), 与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者用药前样本经考核试剂检测结果均为 ALK 基因融合阳性, 与临床既往分子检测结果一致。

申请人对经伴随诊断试剂验证为 ROS1 基因融合阳性的病例中进行了克唑替尼胶囊治疗的回顾性疗效分析, 纳入 18 例晚期 NSCLC 有效病例, 其中 13 例临床评估部分缓解, 3 例评估疾病稳定, 2 例评估疾病进展, 客观缓解率为 72.22% (95% CI 49.13% - 87.50%), 疾病控制率为 88.89% (95% CI 67.20% - 96.90%), 与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符。且受试者用药前样本经考核试剂检测结果均为 ROS1 基因融合阳性, 与临床既往分子检测结果一致。

申请人对经伴随诊断试剂验证为 EGFR 基因 19 外显子缺失或 L858R 突变阳性的病例中进行了盐酸厄洛替尼片治疗的回顾性疗效分析, 纳入 5 例晚期 NSCLC 有效病例, 其中 3 例临床评估部分缓解, 2 例评估疾病稳定, 临床用药客观缓解率为 60.00% (95% CI 23.07% - 88.24%), 疾病控制率为 100.00% (95% CI 56.56% - 100.00%)。且受试者经考核试剂检测结果均为 EGFR 敏感突变 (19 外显子缺失或 L858R) 阳性, 与临床既往分子检测结果一致。但因该部分有效样本量未达到预期统计学要求, 未能进行具有统计学意义的临床研究分析, 故本次临床研究中未明确盐酸厄洛替尼片与本产品伴随关系。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面研究，临床试验符合要求。

四、风险分析及说明书提示

（一）收益评估

肺癌是世界范围内发病率较高的肿瘤之一，主要分为非小细胞肺癌（NSCLC）和小细胞肺癌（SCLC），其中 NSCLC 占 80% 以上。目前，针对 NSCLC 驱动基因突变设计的多种靶向药物已在多个大型临床试验中获得较好效果，其中一些药物已获批在临床上使用，很大程度上提高 NSCLC 患者的生存收益。基于高通量测序的多基因联合检测试剂盒可一次性检测多种基因变异，并且实现更高的检测灵敏度。

在临床研究中，该产品的检测性能与已上市试剂或金标准方法及伴随诊断试剂相比，均具有良好一致性；该产品检测相关基因变异阳性的晚期 NSCLC 病例，用药后客观缓解率达到预期临床疗效，显示该产品可以帮助 NSCLC 患者选择肿瘤靶向治疗方式。

（二）风险评估

1. 检测结果存在假阴性及假阳性的风险

该产品为基于高通量测序的多基因体外诊断产品，检测过程主要包括核酸（DNA）提取纯化、文库制备、探针杂交捕获、高通量测序及生物信息学分析等多个步骤，检测结果

可能受到实验过程中多种因素的影响。

样本的来源、采集过程、样本质量及核酸提取质量等因素均可能影响检测的准确性，从而导致假阴性或假阳性的检测结果。在产品研发阶段，对配套的核酸提取试剂进行了验证，并设定了质控标准。在样本收集及核酸提取过程中须使用产品说明书中推荐的配套试剂，并严格按照质量标准进行核酸质控。

测序前实验操作、测序仪及数据分析软件等因素也可能对检测结果的准确性造成影响。为确保检测质量，在产品研发阶段对各步骤产物质量确定了质控标准，对配套的MiSeqDX基因测序仪（见说明书）也进行了验证，并且配套开发了测序数据分析及结果判读的生物信息分析软件。在检测过程中须严格按照质量标准进行质控，并使用该产品说明书中推荐的配套试剂、仪器及软件进行检测和数据分析，本产品尚未对其他配套测序仪及软件进行验证。

使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险及检测的局限性。不符合说明书中【样本要求】的样本和不恰当的实验操作会导致假阴性或假阳性结果，请严格按照产品说明书中【样本要求】及【检验方法】的要求操作和进行实验过程质控。同时，由于肿瘤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验结果。

此外，实验环境同样可能影响检测结果。该产品在检测

过程中涉及 PCR 扩增，操作过程中气溶胶泄露也可能会导致实验室污染。因此请在可控的基因扩增实验室环境进行检测操作，区分试剂准备区、样本制备区、PCR 扩增区及上样测序区。并需根据《医疗机构临床基因扩增管理办法》对操作人员进行专业培训，非专业的操作及操作不当可能会影响检测质量。

该产品阴性检测结果不能完全排除基因突变的存在。导致检测结果假阴性的原因可能包括：肿瘤样本中肿瘤细胞较少、肿瘤组织异质性、基因突变类型不在试剂盒检测范围内、突变比例低于试剂盒最低检测限、样本降解、样本污染、样本中存在过量干扰物质、不正确的样本保存、不正确的试剂盒保存、试剂盒过期、不恰当的实验操作等等。

2. 检测试剂的安全性风险

检测流程中涉及到的配套试剂盒含氢氧化钠，具有刺激性及腐蚀性，吸入或接触可能对鼻黏膜、呼吸道及皮肤等造成灼伤；二甲基亚砜（DMSO）可能造成恶心、呕吐、皮肤灼伤反应等。实际操作过程中应注意穿戴保护性服装及安全操作，以降低实验风险。

（三）产品尚待完善的性能

该产品尚有多个未经伴随诊断验证的基因突变类型，需要在产品上市后继续收集药物疗效相关信息。

（四）收益—风险的确定

通过对环境的严格监测、对生产过程的严格监控、在产品说明书中给出详细的操作流程和注意事项、对实验人员进行专业培训及安全培训等防范措施可以对该产品的已知和可预见的风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险。在目前认知水平上，认为该产品带来的获益/收益大于风险。

尽管目前认为该产品的获益/收益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以下信息：

1. 适用范围：本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织样本中 EGFR、ALK、ROS1、BRAF、KRAS、HER2 基因的多种变异。其中，EGFR 基因 19 外显子缺失及 L858R 点突变用于吉非替尼片及盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测，T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测；ALK 基因融合和 ROS1 基因融合用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测。该产品检测范围内的其他基因突变均未与靶向药物进行过安全性和有效性的联合临床试验评估，仅进行了性能验证，因此不能用于伴随诊断检测。

2. 警示及注意事项：产品说明书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医疗器械产品注册，属于创新审批项目（编号：201700001）。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 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 2014 年第 5 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。申请人在该产品上市后应继续对产品伴随诊断用途进行验证。请在至少两家临床机构随访收集伴随诊断 4 种药物（吉非替尼、埃克替尼、克唑替尼、奥希替尼）的临床用药疗效随访数据，作为临床补充资料在产品下一次延续注册时提交。临床用药疗效随访数据应包括：病理诊断信息，应用本产品检测信息，患者用药疗效终点至最佳疗效的疗效数据，每种药物相关数据应满足统计学意义。该项临床资料应由出具数据的各临床试验机构签章。

EGFR/ALK/ROS1/BRAF/KRAS/HER2 基因突变检测试剂盒（可逆末端终止测序法）说明书

【产品名称】

EGFR/ALK/ROS1/BRAF/KRAS/HER2 基因突变检测试剂盒
（可逆末端终止测序法）

【包装规格】

12 人份/盒；48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测非小细胞肺癌（NSCLC）患者经福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）组织标本中 EGFR 基因、ALK 基因、ROS1 基因、BRAF 基因、KRAS 基因及 HER2 基因的多种变异。其中，EGFR 基因 19 外显子缺失及 L858R 点突变用于吉非替尼片及盐酸埃克替尼片的伴随诊断检测；EGFR T790M 点突变用于甲磺酸奥希替尼片的伴随诊断检测；ALK 基因融合和 ROS1 基因融合用于克唑替尼胶囊的伴随诊断检测（具体可参考表 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	基因及变异类型
吉非替尼片	EGFR: 19 外显子缺失、L858R
盐酸埃克替尼片	EGFR: 19 外显子缺失、L858R
甲磺酸奥希替尼片	EGFR: T790M
克唑替尼胶囊	ALK 融合、ROS1 融合

表 2 中为本试剂盒可以准确检出，但未经伴随诊断验证的基因突变类型。

表 2：未经伴随诊断验证的基因突变类型

基因名称	突变类型
EGFR	G719 位点突变、L861Q
BRAF	V600E
KRAS	G12 位点突变、G13 位点突变
HER2	20 外显子插入突变

其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及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

肺癌是最常见的肺部原发性恶性肿瘤，也是我国最常见的恶性肿瘤之一^[1]。其中非小细胞肺癌在肺癌中占比 85% 以上，小细胞肺癌占比不到 15%^[2]。

非小细胞肺癌是一种高度异质性的肿瘤，有多种分子亚型。常见的驱动基因包括 EGFR、ALK、ROS1、BRAF、KRAS、HER2、MET、RET 等。经过多年的发展，目前有多种靶向药物获批上市，包括 EGFR 酪氨酸激酶抑制剂（TKI）如吉非替尼、厄洛替尼、埃克替尼、阿法替尼、奥希替尼；ALK 抑制剂如克唑替尼、色瑞替尼、艾乐替尼；ROS1 抑制剂克唑替尼；BRAF 抑制剂达拉菲尼和 MEK 抑制剂曲美替尼；同时还有其它多种靶向药物正在进行临床试验^[3]。

EGFR 基因突变是最早发现的治疗晚期 NSCLC 的基因靶点，也是肺癌主要的驱动基因突变，在肺癌中的发生频率为 40-55%^[4]。EGFR 基因常见突变包括 19 外显子缺失和 21 外显子 L858R 突变，其它突变如 18 外显子 G719 位点突变、20 外显子插入、S768I 突变，21 外显子 L861Q 突变等。EGFR 敏感突变阳性的晚期 NSCLC 患者使用一代 EGFR TKI 后，往往会发生耐药。其中 EGFR T790M 突变

是最常见的耐药机制。携带 EGFR T790M 突变的晚期 NSCLC 患者对奥希替尼敏感^[1,3,5]。

ALK 基因融合在 NSCLC 中的发生率为 3%-7%，常见于年轻不吸烟的女性患者中。ALK 抑制剂如克唑替尼在治疗 ALK 融合阳性的 NSCLC 显示出巨大临床收益，目前有多种 ALK 抑制剂在国外获批上市，其中克唑替尼已在国内上市^[3,5,6]。

ROS1 基因融合在 NSCLC 中的发生率约为 2%，目前已发现多种不同 ROS1 融合基因^[4]。克唑替尼可为 ROS1 阳性的 NSCLC 患者带来较大临床获益，于 2016 年被 FDA 批准上市^[7]。目前在国内也已获批用于治疗 ROS1 阳性的局部晚期或转移性 NSCLC。

BRAF 基因编码 MAPK 通路中的丝氨酸蛋白激酶，主要突变类型为 V600E 位点突变，在肺癌中发生频率约为 1-2%^[4]。FDA 已经批准达拉菲尼联合曲美替尼用于 BRAF V600E 突变阳性的晚期转移性 NSCLC^[8]。

KRAS 基因是 RAS 基因家族中 3 种癌基因之一，为 EGFR 信号通路中一个关键的下游信号分子。KRAS 突变在肺癌中发生频率较高，为 8-10%^[4]，KRAS 突变可导致 EGFR 抑制剂原发耐药，也是 NSCLC 的不良预后因子^[9,10,11]。KRAS 突变检测可鉴别出无法进一步分子诊断检测及靶向药物中获益的 NSCLC 患者^[3]。

HER2 是具有受体酪氨酸激酶(RTK)活性的跨膜蛋白，属于表皮生长因子受体(EGFR)家族，又称表皮生长因子受体 2。HER2 在肺癌中的发生频率为 2-3%^[4]。在一项临床研究中，3800 名 NSCLC 患者中，共 65 人携带 HER2 20 外显子插入突变（1.7%），其中 16 人接受抗 HER2 治疗。治疗后 11 人部分响应，7 人疾病稳定，4 人疾病进展，ORR 为 50%，疾病控制率 82%^[12]。关于 NSCLC 中抗 HER2 的其他临床研究目前在进展中。

【检验原理】

本试剂盒采用 DNA 探针捕获技术，首先对从 NSCLC 肿瘤 FFPE 样本中提取的核酸（DNA）进行片段化、加接头、PCR 扩增等步骤制备文库；其后采用具有特定序列的 DNA 探针与文库进行杂交，从而特异性捕获来自人类基因组 6 种基因中的部分外显子与内含子区域，之后通过磁珠法富集被探针捕获的目标区域 DNA 片段。在对捕获富集后的文库进行定量与质控后，采用基因测序仪（型号：MiSeqDx，Illumina 公司生产）进行高通量测序。对于测序数据，采用生物信息学软件判读 6 种靶基因中是否存在来自肿瘤的变异。

下表为本试剂盒检测步骤简表。本试剂盒包含阴、阳性对照品，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

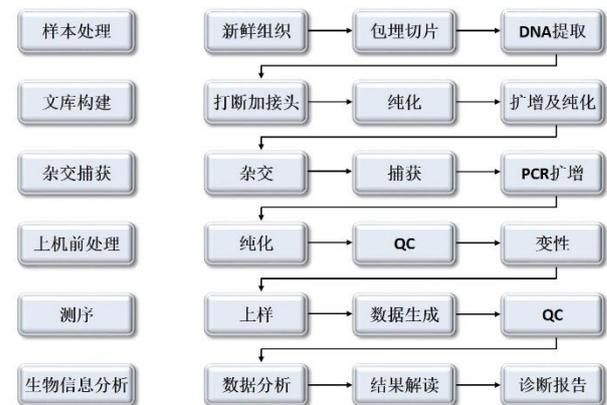


图 1 试剂盒检测步骤示意图

【主要组成成分】

组分编号	组分名称	管盖颜色	12 人份/盒	48 人份/盒
B1	修复缓冲液	黄色	84μL*1 管	350μL*1 管
E1	修复反应液	黄色	36μL*1 管	150μL*1 管
A01-A24	接头 1-24	绿色	5μL*24 管	11 μL*24 管
E2	连接酶	绿色	120μL*1 管	490 μL*1 管
B2	连接缓冲液	绿色	360μL*1 管	1470μL*1 管
E3	PCR 扩增反应液	粉色	480μL*1 管	1500μL*1 管
P1	PCR 扩增引物	粉色	96μL*1 管	290μL*1 管
P2	富集探针	红色	7.5μL*1 管	11μL*1 管
B3	DNA 封闭液	红色	15μL*1 管	21μL*1 管
S1	封闭序列	红色	6μL*1 管	9μL*1 管
B4	杂交缓冲液 1	红色	22.5μL*1 管	32μL*1 管
B5	杂交缓冲液 2	红色	9μL*1 管	13μL*1 管
W1	清洗缓冲液 1	白色	90μL*1 管	128μL*1 管
W2	清洗缓冲液 2	白色	60μL*1 管	85μL*1 管
W3	清洗缓冲液 3	白色	60μL*1 管	85μL*1 管
W4	清洗缓冲液 4	白色	120μL*1 管	170μL*1 管
BW	磁珠清洗液	白色	600μL*1 管	840μL*1 管
NC	阴性对照品	蓝色	150μL*1 管	200μL*1 管
PC	阳性对照品	蓝色	150μL*1 管	200μL*1 管
MB	磁珠	白色	300μL*1 管	425μL*1 管

注：同一组分不同批号不能混用。

组分编号	组分名称	主要组成成分
B1	修复缓冲液	Tris-HCl、MgCl ₂ 、DTT、ATP、dNTP
E1	修复反应液	Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 聚合酶、T4 聚核苷酸激酶
A01-A24	接头 1-24	Hepes 缓冲液、双链寡核苷酸接头
E2	连接酶	T4 DNA 连接酶
B2	连接缓冲液	Tris-HCl、MgCl ₂ 、DTT、ATP、PEG6000
E3	PCR 扩增反应液	Tris-HCl、10% 甘油、MgCl ₂ 、高保真热启动 DNA 聚合酶、dNTP、NP-40
P1	PCR 扩增引物	5μM 通用引物 1，5μM 通用引物 2
P2	富集探针	富集探针
B3	DNA 封闭液	Human Cot-1 DNA
S1	封闭序列	寡核苷酸序列
B4	杂交缓冲液 1	SSC 缓冲液、磷酸钠、SDS
B5	杂交缓冲液 2	多聚蔗糖、聚乙烯吡咯烷酮、牛血清白蛋白
MB	磁珠	链霉亲和素标记磁性微球
W1	清洗缓冲液 1	SSC 缓冲液、SDS
W2	清洗缓冲液 2	SSC 缓冲液、SDS
W3	清洗缓冲液 3	SSC 缓冲液
W4	清洗缓冲液 4	SSC 缓冲液、SDS
BW	磁珠清洗液	Tris-HCl、Tween-20
NC	阴性对照品	汉族健康人 DNA、TE 缓冲液
PC	阳性对照品	EGFR L858R、ALK 融合、ROS1 融合、

		BRAF V600E、KRAS G12C 及 HER2 20 外显子插入突变序列的 DNA、汉族健康人 DNA、TE 缓冲液
--	--	--

注：同一组分不同批号不能混用。

本试剂盒不包含，但推荐配套使用的试剂和软件如下：

用途	名称	注册/备案证号
核酸提取	QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (凯杰生物工程(深圳)有限公司生产)	粤深械备 20160266 号
核酸纯化	核酸纯化试剂(南京世和医疗器械有限公司生产)	苏宁械备 20160006 号
文库定量	Qubit® dsDNA HS Assay Kit (ThermoFisher 公司生产)	
	KAPA Library Quantification Kit (KAPA Biosystems 公司生产)	
测序	MiSeqDx Reagent Kit v3 (Illumina 公司生产)	国械备 20180410 号
数据分析	非小细胞肺癌基因突变分析软件 (南京世和医疗器械有限公司生产)	测序

注：推荐配套使用的试剂及软件应明确医疗器械分类，获得上市许可或经备案后使用。

【储存条件及有效期】

1. 本试剂盒于-20℃±5℃条件下保存(磁珠于 2~8℃条件下保存)有效期为 10 个月。
2. 试剂盒反复冻融次数不超过 4 次，开封使用后应尽快用完。
3. 生产日期及有效期至：见标签

【适用仪器】

基因测序仪(型号：MiSeqDx)，Illumina 公司生产。

【样本要求】

保存年限不超过 2 年的 FFPE 样本，均可使用本试剂盒检测。样本必须按照标准的病理学方法进行处理和保存，以确保样本的质量。组织样本中肿瘤细胞占比应达 20% 及以上。

【检验方法】

1. 样本处理

1.1 蜡块样本准备

- a. 用刀片修整 FFPE 样本上组织周围多余的石蜡。
- b. 根据组织大小，切取 5-10μm 厚的组织 2-8 张。
- c. 将样本置入已做好标记的 1.5mL 离心管中。
- d. 向装有样本的 1.5mL 离心管中加入 1mL 二甲苯。涡旋振荡器充分振荡 10s (也可置于恒温金属浴上 56℃，800rpm，10min)。
- e. 使用室温高速离心机在最大转速下离心 5min。实验全程在室温下(15℃~25℃)进行。
- f. 离心结束后，使用移液器吸取并移弃上部已溶解石蜡的二甲苯溶液，操作中注意不要移弃下面的组织。
- g. 重复 d~f
- h. 加入 1mL 96-100% 乙醇，涡旋振荡器充分振荡，充分溶解组织中残留的二甲苯。
- i. 在室温下放置 5min，最大转速离心 5min。
- j. 使用移液器吸取并移弃上部已溶解二甲苯的乙醇溶液，操作中注意不要移弃下面的组织。
- k. 重复 h~j
- l. 打开离心管盖，室温下静置孵育 10min 或使用干燥机干燥至残

余乙醇全部挥发。

1.2 切片样本准备

- 根据组织大小，取用 2-8 张切片。
- 用刀片将切片上组织刮下，置入已做好标记的 1.5mL 离心管中。
- 向装有样本的 1.5mL 离心管中加入 1mL 二甲苯。涡旋振荡器充分振荡 10s（也可置于恒温金属浴上 56℃，800rpm，10min）。
- 使用室温高速离心机在最大转速下离心 5min。实验全程在室温下进行。
- 离心结束后，使用移液器吸取并移弃上部已溶解石蜡的二甲苯溶液，操作中注意不要移弃下面的组织。
- 重复 c~e
- 加入 1mL 96-100%乙醇，涡旋振荡器充分振荡，充分溶解组织中残留的二甲苯。
- 在室温下放置 5min，最大转速离心 5min。
- 使用移液器吸取并移弃上部已溶解二甲苯的乙醇溶液，操作中注意不要移弃下面的组织。
- 重复 g~i
- 打开离心管盖，室温下静置孵育 10min 或使用干燥机干燥至所有残余乙醇全部挥发。

1.3 蜡卷样本准备

- 保存在 1.5mL 离心管中的蜡卷可直接使用；如果蜡卷保存在其他容器中，则需将蜡卷转移到 1.5mL 离心管。
- 向装有样本的 1.5mL 离心管中加入 1mL 二甲苯。涡旋振荡器充分振荡 10s（也可置于恒温金属浴上 56℃，800rpm，10min）。
- 使用室温高速离心机在最大转速下离心 5min。实验全程在室温下进行。
- 离心结束后，使用移液器吸取并移弃上部已溶解石蜡的二甲苯溶液，操作中注意不要移弃下面的组织。
- 重复 b~d
- 加入 1mL 96-100%乙醇，涡旋振荡器充分振荡，充分溶解组织中残留的二甲苯。
- 在室温下放置 5min，最大转速离心 5min。
- 使用移液器吸取并移弃上部已溶解二甲苯的乙醇溶液，操作中注意不要移弃下面的组织。
- 重复 f~h
- 打开离心管盖，室温下静置孵育 10min 或使用干燥机干燥至所有残余乙醇全部挥发。

1.4 核酸提取（QIAamp DNA FFPE Tissue Kit）

- 加入 180μL buffer ATL 及 20μL 蛋白酶 K 重悬沉淀，涡旋振荡器充分振荡。
- 置于恒温金属浴 56℃，800 rpm 孵育 1 小时（或直至组织完全裂解）。
- 90℃孵育 1 小时。注意严格控制温度以及孵育时间。如果使用 1 台加热块，56℃孵育结束后取出样品，待加热块升至 90℃再将样品放入。
- 取出样本放至室温，补加 5μL 蛋白酶 K，56℃，800rpm 振荡消化 15min。
- 将标本取出并快速离心，将离心管盖以及侧壁的液体甩入管中。待标本冷却至室温时，加入 2μL RNase A，以去除溶液中残存的 RNA。
- 在每个样本中加入 200μL buffer AL，涡旋振荡充分混匀。然后加入 200μL 无水乙醇，并立即涡旋振荡充分混匀。如同时处理多个样本，为节省时间可将缓冲液 AL 和乙醇提前预混一起加入样本。
- 再次快速离心，将离心管盖以及侧壁的液体甩入管中。
- 将包装内的 QIAamp MinElute 柱取出并按照标本次序做好对应的标记。仔细的将离心管中全部悬液移至 QIAamp MinElute 柱中，6000×g 离心 1min，之后将下方收集管中的滤过液以及收集

管一并丢弃。

- 将离心完毕的吸附柱置于新的收集管中，小心打开盛放样品的吸附柱盖子，加入 500μL AW1。盖好盖子后室温放置 1min，6000×g 离心 1min，离心后将下方收集管中的滤过液以及收集管一并丢弃。
- 将离心完毕的吸附柱置于新的收集管中，小心打开盛放样品的吸附柱盖子，分别加入 500μL AW2。盖好盖子后室温放置 1min，6000×g 离心 1min，离心后将下方收集管中的滤过液以及收集管一并丢弃。
- 将离心完毕的吸附柱置于新的收集管中，将离心机调至最高转速，至少达到 20,000×g 或 14,000 rpm，离心 3min，甩尽吸附柱内残存的乙醇。
- 准备对应标记好的 1.5mL 离心管，将离心完毕的吸附柱放置于离心管中，并丢弃下方的废液收集管。小心打开吸附柱盖子，加入 100μL 无酶水至吸附膜中央。
- 盖好盖子室温孵育 5min，之后将离心机调至最大转速，至少达到 20,000×g 或 14,000 rpm，离心 1min。

1.5 DNA 样本质量要求

提取后的 DNA 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 定量，DNA 总量应不少于 0.25μg；使用 Nanodrop 检测纯度，OD_{260/280} 应不低于 1.8。

注：提取后的样本 DNA，如不立即进行后续实验，可在-20℃以下保存 12 个月。

2. 文库构建

2.1 DNA 打断

取试剂盒中阳性对照品（PC）和阴性对照品（NC）各 50μL 与待测样本同步检测，待测样本按照如下步骤进行操作：

- DNA 进入量为 0.25-1.0μg，选择破碎片段大小为 350bp。
- 推荐使用 Diagenode Bioruptor 超声破碎仪或 Covaris M220 Focused-Ultrasonicator 聚焦超声破碎仪进行超声打断。推荐打断条件如下：

Diagenode Bioruptor 超声打断			
Time on(sec)	Time off(sec)	Cycles	Temperature (°C)
30	30	6	4

Covaris M220 超声打断-30sec			
Peak Power	Duty Factor	Cycles/Burst	Temperature (°C)
50	20	200	6

2.2 磁珠纯化（核酸纯化试剂（南京世和医疗器械有限公司生产））

- 核酸纯化试剂在使用前充分漩涡震荡混匀。
- 加入样品体积 1.5 倍的核酸纯化试剂，用移液器上下混匀 10 次。
- 室温下静置 5min 后，置于磁力分离架上 5min，直至上清澄清。小心移去上清。
- 置于磁力分离架上，加入 200μL 新鲜配制的 80%乙醇，室温静置 30sec，吸弃上清。
- 重复步骤 d，并尽量去除所有残留乙醇溶液。
- 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥，使乙醇全部挥发。
- 加入 53μL 无酶水，使用移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。
- 置于 1.5mL 磁力架上 5min，取 50μL DNA 溶液进入下一步文库构建实验。

2.3 末端修复加 A

- 在 0.2mL PCR 管中，按下表配制文库混合液 1。

组分	混合液 1 所需加样量	终体积
DNA 片段	50μL	60μL
E1	3μL	

B1	7μL	
----	-----	--

- b. 使用移液器上下吹吸将液体混匀，快速离心收集液体。
c. 将文库混合液 1 置于 PCR 热循环仪中按照以下条件进行孵育。

步骤	温度	持续时间
1	20℃	30min
2	65℃	30min
3	降温至 4℃	

2.4 加接头

- a. 孵育完成后按下表向装有混合液 1 的反应管中加入试剂盒内相应组分试剂，完成混合液 2 配制（配置过程于冰上完成）。

组分	混合液 2 所需加样量	终体积
混合液 1	60μL	110μL
无酶水	5μL	
E2	10μL	
B2	30μL	
接头	5μL	

注：同批次检测时，不同样本分别加入不同编号的接头试剂。

- b. 使用移液器上下吹吸将液体混匀，快速离心收集液体。将反应管置于 PCR 仪上，20℃ 孵育 15min。

2.5 磁珠纯化（核酸纯化试剂（南京世和医疗器械有限公司生产））

- a. 核酸纯化试剂在使用前充分漩渦震荡混匀。
b. 连接反应完成后，立即加入连接反应体积 0.85 倍的核酸纯化试剂。使用移液器上下混匀 10 次。
c. 室温下静置 5min 后，置于磁力分离架上 5min，直至上清澄清。小心移去上清。
d. 置于磁力分离架上，加入 200μL 新鲜配制的 80% 乙醇，室温静置 30sec，吸弃上清。
e. 重复步骤 d，并尽量去除所有残留乙醇溶液。
f. 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥，保证所有乙醇全部挥发。
g. 加入 22.5μL 无酶水，使用适宜量程的移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。
h. 置于磁力架上 5min，取 20μL DNA 溶液进入 PCR 扩增。

2.6 PCR 扩增

- a. 按下表加入试剂，配制混合液 3（配置过程于冰上完成）：

组分	混合液 3 所需加样量	终体积
E3	25μL	50μL
P1	5μL	
纯化产物	20μL	

- b. 使用移液器上下吹吸将液体混匀，短暂离心收集液体。
c. 将配制好的混合液 3 置于 PCR 仪，按以下反应程序扩增：

步骤	温度	持续时间	循环数
1	98℃	45sec	1
2	98℃	15sec	4-7*
	60℃	30sec	
	72℃	30sec	
3	72℃	1min	1
4	降温至 4℃		

*根据样本质量及进入量选择适当循环数，以获得足够文库进行富集。推荐 250ng 进入量使用 7 个 PCR 循环，样本量每增加约 1 倍，可减少 1 个 PCR 循环。

2.7 磁珠纯化（核酸纯化试剂（南京世和医疗器械有限公司生产））

- a. 核酸纯化试剂在使用前充分漩渦震荡混匀。

- b. 加入 PCR 反应终体积等量的核酸纯化试剂。使用适宜量程的移液器上下混匀 10 次。
c. 室温下静置 5min 后，置于磁力分离架上 5min，直至上清澄清。小心移去上清。
d. 置于磁力分离架上，加入 200μL 新鲜配制的 80% 乙醇，室温静置 30sec，吸弃上清。
e. 重复步骤 d，并尽量去除所有残留乙醇溶液。
f. 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥，保证所有乙醇全部挥发。
g. 加入 23μL 无酶水，使用移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。
h. 置于磁力架上 5min，取 20μL DNA 溶液进入下一步文库富集。取 1μL 使用 Qubit® dsDNA HS Assay Kit 进行 DNA 定量。

3. 杂交捕获

3.1 文库杂交

- a. 文库池常包含多个不同样本文库，根据文库 DNA 浓度计算文库池进入量，混合获得文库池。文库池 DNA 总量为 0.5-2.0μg，建议同质量样本建立文库池。
b. 文库池 DNA 混合方案：文库扩增比例（ X_i ）= 扩增并纯化后文库 DNA 总量/打断前 DNA 样本进入量。
文库平均扩增比例（ \bar{X} ）= $(X_1 + X_2 + \dots + X_n) / n$ ，即该文库池中，各样本文库扩增比例的平均数。

样本类型	文库扩增比例	文库进入量系数
临床样本	$X_i > \bar{X}$	1
	-	-
阳性对照品	/	0.067
阴性对照品	/	0.333

根据上表计算每个样本的文库进入量系数，依照该系数和文库池总量计算每个样本的文库富集进入量，从而混合各样本得到文库池。

- c. 文库池按下表加入试剂，于 1.5mL 离心管中配制混合液 4。

组分	混合液 4 所需加样量
文库池 DNA	总量 0.5-2.0μg
B3	5μL
S1	2μL

- d. 使用移液器上下吹吸将液体混匀，短暂离心收集液体。
e. 使用可控温真空干燥仪，建议设置干燥温度 45℃，打开管盖，直至混合液 4 干燥完全。
f. 另取 0.2mL PCR 管，按下表加入试剂盒内相应组分，配制混合液 5：

组分	混合液 5 所需加样量	终体积
B4	7.5μL	12.5μL
B5	3μL	
无酶水	2μL	

- g. 将 12.5μL 混合液 5 加入到干燥后混合液 4 的反应管中，室温静置 10min。使用移液器上下吹吸 10 次，完全溶解 DNA 后，转移至新的 PCR 管中。
h. PCR 管置于 PCR 仪并设定程序：95℃ 加热 10min。降温至 65℃ 保温，迅速取出 PCR 管，向每个反应管中加入 2.5μL 探针组分（P2），用移液枪上下快速吹吸混匀 10 次，配制成文库杂交混合液（总体积 15μL），重新盖好 PCR 管盖。
i. 将配制好的文库杂交混合液置于 PCR 仪中，设定 65℃，加热 16-18 小时。

3.2 文库捕获和清洗

a. 按下表稀释富集试剂（单个富集反应试剂用量）：

组分	所需体积	加入无酶水体积	1X 终体积
W1	30 μ L	270 μ L	300 μ L
W2	20 μ L	180 μ L	200 μ L
W3	20 μ L	180 μ L	200 μ L
W4	40 μ L	360 μ L	400 μ L
BW	200 μ L	300 μ L	500 μ L

- b. 在恒温金属浴上 65 $^{\circ}$ C 预热 100 μ L 清洗缓冲液 1 (W1) 及 400 μ L 清洗缓冲液 4 (W4)。
- c. 取出试剂盒中的磁珠组分 (MB) 漩涡震荡 3-5s, 重悬沉淀的磁珠, 恢复分散状态, 每个富集反应取 100 μ L 至 1.5mL 低吸附离心管中, 室温静置 30min。
- d. 将磁珠放于磁力分离架上约 1min, 吸弃上清。
- e. 每 100 μ L 磁珠用 200 μ L 磁珠清洗液 (BW) 重悬, 移液枪上下吹吸混匀 10 次。将磁珠放于配套的磁力分离架上静置约 1min, 吸弃上清。
- f. 重复步骤 e, 取 100 μ L 磁珠清洗液 (BW) 重悬, 用移液枪上下吹吸混匀 10 次, 并将混匀液转移至新 PCR 管中。
- g. PCR 管放于磁力分离架上约 1min, 吸弃上清, 立即加入 15 μ L 杂交后的文库混合液。将 PCR 管从磁力架上取下, 移液枪上下吹吸混匀 10 次, 使磁珠在文库杂交混合液中充分重悬。
- h. 将 PCR 管置于 PCR 仪中, 设置 65 $^{\circ}$ C 孵育 45min。每隔 15min 使用移液枪上下吹吸混匀 5 次, 以尽量保证磁珠在孵育过程中处于悬浮状态。
- i. 孵育结束后, 加入 100 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的清洗缓冲液 1 (W1), 使用移液枪上下吹吸混匀 10 次, 并转移到 1.5mL 低吸附离心管中。将离心管放于磁力分离架上约 1min, 吸弃上清。
- j. 离心管中加入 200 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的清洗缓冲液 4 (W4), 移液枪上下吹吸混匀 10 次后置于恒温金属浴 65 $^{\circ}$ C 孵育 5min (转速 400rpm)。孵育后离心管放于磁力分离架上约 1min, 吸弃上清。
- k. 重复步骤 j 一次。
- l. 依次加入室温清洗缓冲液 W1-W3 进行富集清洗: 先加入 200 μ L 室温清洗缓冲液 1 (W1), 涡旋点震 2min。离心管放于磁力分离架上约 1min, 吸弃上清。
- m. 加入 200 μ L 室温清洗缓冲液 2 (W2), 涡旋点震 1min。离心管放于磁力分离架上约 1min, 吸弃上清。
- n. 加入 200 μ L 清洗缓冲液 3 (W3), 涡旋点震 30sec。离心管放于磁力分离架上约 1min, 尽量吸弃全部残留液体。
- o. 将离心管继续置于磁力架上, 室温开盖干燥 3min, 以去除残留水分, 尽量干燥磁珠。
- p. 将离心管从磁力架上取下, 加入 40 μ L 无酶水重悬磁珠, 移液枪上下吹吸混匀 10 次。按 20 μ L/管将磁珠悬液等量分装至 2 个 PCR 管中, 分别标记为 1 号管和 2 号管, 并分别进行后续实验。

3.3 PCR 扩增

a. 1 号管、2 号管分别按下表加入试剂, 配制得到 2 管混合液 6。

组分	每个反应配制混合液 6 所需加样	终体积
E3	25 μ L	50 μ L
P1	5 μ L	
磁珠悬液	20 μ L	

b. 将 2 管混合液 6 分别置于 PCR 仪上, 按下反应程序扩增,

步骤	温度	持续时间	循环数
1	98 $^{\circ}$ C	10min	1
	98 $^{\circ}$ C	15sec	12-15*

2	60 $^{\circ}$ C	30sec	
	72 $^{\circ}$ C	1min	
3	72 $^{\circ}$ C	5min	1
4	降温至 4 $^{\circ}$ C		

* 循环数根据富集起始样本量而定, 推荐 500ng 进入量使用 15 个 PCR 循环。样本量每增加 1 倍, 可减少一个 PCR 循环。

4. 上机前处理

4.1 磁珠纯化 (核酸纯化试剂 (南京世和医疗器械有限公司生产))

- a. 合并 2 管混合液 6 扩增产物, 核酸纯化试剂在使用前充分漩涡震荡混匀。
- b. 加入 PCR 反应终体积 1.5 倍的核酸纯化试剂重悬。使用移液器上下混匀 10 次。
- c. 室温下静置 5min 后, 置于 1.5mL 磁力分离架上 5min, 直至上清澄清。小心吸弃上清。
- d. 置于磁力分离架上, 加入 500 μ L 新鲜配制的 80% 乙醇, 室温静置 30sec, 吸弃上清。
- e. 重复步骤 d, 并尽量去除所有残留乙醇溶液。
- f. 离心管留于磁力架上室温开盖 5min 干燥, 保证乙醇全部挥发。
- g. 加入 23 μ L 无酶水, 使用适宜量程的移液器上下混匀 10 次。室温孵育 5min。
- h. 置于 1.5mL 磁力架上 5min, 取 20 μ L 作为待上样富集文库, 取 1 μ L 使用 Qubit[®] dsDNA HS Assay Kit 进行 DNA 定量, 以计算富集文库浓度及总量。

注: 纯化后富集文库若不能立即上机测序, 可在 -20 $^{\circ}$ C 以下保存 30 天。

4.2 文库质检

4.2.1 文库质量分析 (可选择步骤)

- a. 将 1 μ L 富集文库稀释至 1pg/ μ L
- b. 按下表加入试剂, 配制混合液 7

组分	每个反应配制混合液 7 所需加样量	终体积
E3	10 μ L	20 μ L
P1	2 μ L	
稀释文库	1 μ L	
水	7 μ L	

c. 混合液 7 按以下反应程序进行 PCR 扩增

步骤	温度	持续时间	循环数
1	98 $^{\circ}$ C	10min	1
2	98 $^{\circ}$ C	15sec	30
	60 $^{\circ}$ C	30sec	
	72 $^{\circ}$ C	1min	
3	72 $^{\circ}$ C	1min	1
4	降温至 4 $^{\circ}$ C		

- d. PCR 产物使用凝胶电泳仪 (参考条件: 1-1.5% 琼脂糖凝胶, 90V 电压) 电泳 40min。
- e. 检查电泳条带大小是否符合破碎片预期大小。

4.2.2 文库 qPCR 定量

使用 KAPA Library Quantification Kit 试剂盒对待上机富集文库进行定量, 以调整至合适上机浓度。

4.2.2.1 试剂准备

- a. 准备适量的 DNA 稀释缓冲液: 使用无酶水将 1X IDTE 缓冲液稀释至 0.1X, 每个文库均需 1.2mL 稀释缓冲液。使用前将缓冲液放至室温。
- b. 冰上解冻试剂盒中各组分, 使用前充分混匀, 短暂离心, 置于冰上备用。

4.2.2.2 样本准备

- 准备适当的文库稀释液（使用 DNA 稀释缓冲液）。取 1 μ L 富集文库进行 1: 1,000、1: 10,000、1: 100,000 稀释。
- 如需使用，准备内部对照品 ROX 稀释液。

4.2.2.3 点样及程序设置

- 向 PCR 反应板需要进行反应的孔中各加入混有引物的 6 μ L Master Mix。
- 向每个样本孔中加入对应的 4 μ L 已稀释的 DNA 文库（1:1000 和 1:10000）。
- 向标准品孔中各加入 4 μ L DNA 标准品，按照从低浓度到高浓度顺序加入。
- 向阴性对照孔中加入 4 μ L 稀释缓冲液。
- 密封 PCR 反应板，放入微孔板离心机中离心 1min。
- 将反应板装载到 qPCR 仪上并按照下表参数运行 qPCR 仪：

步骤	温度	时间	循环数
预变性	95 $^{\circ}$ C	5min	1
变性	95 $^{\circ}$ C	30sec	35
退火/延伸/数据采集	60 $^{\circ}$ C	45sec	
溶解曲线分析	65-95 $^{\circ}$ C		

4.2.2.4 数据分析

- 按照 KAPA Library Quantification Kit 试剂盒说明书进行待检文库的浓度计算。
- 若最终文库总摩尔质量 <0.02 pmoles，需要重新进行文库杂交富集或重新进行建库，若再次不合格，终止检测。

5. 测序**5.1 文库预处理**

- 5.1.1. 准备变性试剂：取 200 μ L 1N 文库变性液浓储，加 800 μ L 无水水配置成 0.2N 文库变性液，涡旋混匀，短暂离心，室温放置备用。
- 5.1.2. 文库变性：取 5 μ L 文库（4nM）至低吸咐管管底，再加入 5 μ L 0.2N 文库变性液，吹打混匀。关闭管盖室温孵育 5min，之后立即置于冰上。
- 5.1.3. 文库稀释：变性后的 10 μ L 文库中加入 990 μ L 冰上预冷的稀释缓冲液，混匀后快速离心，置于冰上备用。

5.2 上样

- 5.2.1. 使用洁净的 1 mL 枪头刺穿 Load Samples（装入样品）孔的封箔，将 600 μ L 已制备文库注入 Load Samples（装入样品）孔中。避免接触封箔。
- 5.2.2. 加载样品后检查孔中是否有气泡，如果有气泡在工作台轻轻敲打试剂盒以释放气泡。
- 5.2.3. 将加载好样品的测序试剂盒使用 MiSeqDx 测序仪（Illumina 公司）进行测序。

6. 生物信息分析与结果解读

本产品结果分析采用《非小细胞肺癌基因突变分析软件》（以下简称分析软件）对原始数据进行分析。分析软件可实现从 MiSeqDx 原始数据下机到报告的自动化分析。相关数据分析流程和阳性判断值如下：

1. 数据预处理：使用 Illumina Sequencing Analysis Viewer v1.8 软件分析每批次数据测序质量 Q30 碱基占比，如批次数据 Q30 碱基占比 $\geq 75\%$ 则质控通过；如批次数据 Q30 碱基占比 $<75\%$ ，则质控不通过。然后使用 Illumina 公司的 bcl2fastq v2.19 软件将 MiSeqDx 测序生成的 BCL 文件转化成样本对应的 FastQ 文件。使用分析软件的数据预处理模块（基于 Trimmomatic-0.36 软件）去除建库过程中引入的接头序列以及低质量碱基片段。
2. 数据比对：使用分析软件的序列比对模块（基于 BWA v0.7 和 GATK v3.4 软件）将 FastQ 文件中的碱基序列比对至 hg19 (GRCh37)

人类参考基因组上生成 BAM 文件，并根据基因组坐标对 BAM 文件进行排序，然后对基因组复杂区域进行序列比对优化。

3. 数据质控：使用分析软件的数据质控模块计算每个样本的 Q30 碱基占比、序列比对至参考基因组比例、目标区域的平均测序深度等参数。如果 Q30 碱基占比 $\geq 75\%$ ，序列比对至参考基因组比例 $\geq 90\%$ ，平均测序深度 $\geq 700X$ ，则样本数据质控通过。如数据质控不通过，则判定实验失败，需要重新实验。
4. 突变分析：使用分析软件的变异鉴定模块（基于 VarScan v2.3 软件）分析样本中的点突变和插入缺失突变，使用分析平台的融合分析模块（基于 Delly v0.7 及 socrates v1.1 软件）分析样本中的融合，分析参数设置要求序列比对质量 ≥ 30 ，碱基质量 ≥ 20 。
5. 突变注释：使用分析软件的注释模块（基于 ANNOVAR v20160425 软件和 VEP v83 软件）对鉴定出的点突变、插入缺失和基因融合进行 HGVS 格式和 COSMIC 数据库(v71)、CLINVAR 数据库 (v20171231)、dbSNP 数据库 (v138)、1000Genomes 数据库 (v201508)、ExAC 数据库 (v0.3) 注释。
6. 阳性判断标准：经过以上 1-5 步分析流程处理后，符合质量指标要求的突变结果进行阴/阳性判断。如突变丰度 $\geq 0.6\%$ 为突变阳性；反之，则判断为阴性。

【检验结果的解释】

1. 阴性对照品（NC）的检测结果应为阴性，若有相关突变检出，说明环境中可能存在 DNA 污染源。
2. 阳性对照品（PC）的检测结果应为 EGFR、ALK、ROS1、BRAF、KRAS、HER2 基因对应突变阳性，如果突变未检出，说明试剂盒性能不理想或操作过程有误，此次检测结果无效。

【检验方法局限性】

1. 本试剂盒仅用于 NSCLC 患者 FFPE 样本的体外定性诊断，其检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊疗的唯一依据。
2. 本试剂盒只对说明书中涵盖的基因及变异类型有效。因此当本试剂盒检测结果为阴性时，并不能排除被检测样本携带本试剂盒检测范围外的其他基因及位点突变。
3. 阴性结果不能完全排除靶基因突变的存在，样本中肿瘤细胞较少、基因变异类型不在试剂盒检测范围内、突变比例低于试剂盒最低检测限、样本降解、样本污染、样本中存在过量干扰物质、不正确的样本保存、不正确的试剂盒保存、试剂盒过期等亦可能产生阴性检测结果。
4. 由于肿瘤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。
5. 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假阳性结果。
6. 本试剂盒仅用于检测保存年限不超过 2 年的 NSCLC FFPE 组织样本，超过 2 年的 FFPE 样本的检测结果可能受到影响。
7. 本试剂盒检测结果与临床诊断结论不一致时，建议对检验结果进行复检，并最终临床诊断结论为准。

【产品性能指标】

1. 阳性参考品符合率：检测企业阳性参考品，检测结果应与对应突变情况一致，符合率 100%。
2. 阴性参考品符合率：检测企业阴性参考品，检测结果为对应位点应无突变，符合率 100%。
3. 精密度（重复性）：精密度参考品重复检测 10 次，检测结果应一致。
4. 最低检测限：能够检出 250ng DNA 样本中变异比例低至 1% 的 EGFR、ROS1、BRAF、KRAS、HER2 基因变异和低至 2.5% ALK 基因融合。
5. 干扰分析：临床 FFPE 样本可能存在的干扰物（酒精、福尔马

林、石蜡、血红蛋白等，浓度分别为 1%V/V、0.005%V/V、1%V/V、2g/L）均不干扰本试剂盒的检测结果；常见病原菌如结核分枝杆菌、肺炎链球菌、铜绿假单胞菌等均不干扰本试剂盒的检测结果。

6. 临床试验结果

(1) 临床试验在 3 家临床机构共同开展，入组样本为 960 例非小细胞肺癌样本和 46 例良性组织干扰样本，共计 1006 例有效样本。样本类型为石蜡包埋组织。选择已上市产品或金标准方法作为对比方法，分别考察 EGFR、ALK、ROS1、BRAF、KRAS 以及 HER2 的多种变异类型，本试剂盒共检测出 716 例基因变异阳性样本。与对比方法相比，考核试剂的定性检测结果阳性符合率为 99.29%，阴性符合率为 95.32%，总体符合率为 98.11%。经 Kappa 一致性检验，结果均显示两者检测具有高度一致性。

(2) 用已上市的伴随诊断试剂进行比较研究，考察 EGFR 基因、ALK 基因、ROS1 基因的多个变异类型。与伴随诊断试剂相比，考核试剂检测 EGFR 基因各变异类型（包含 19 外显子缺失、L858R 突变及 T790M 突变）的阳性符合率、阴性符合率与总体符合率均为 100.00%；ALK 基因融合的阳性符合率为 99.28%，阴性符合率为 100.00%，总体符合率为 99.90%；ROS1 基因融合的阳性符合率、阴性符合率与总体符合率均为 100.00%。经 Kappa 一致性检验，结果均显示两者检测具有高度一致性。

(3) 回顾性靶向药物药效研究共计 118 例晚期 NSCLC 有效病例，其中吉非替尼片（易瑞沙）23 例、盐酸埃克替尼片（凯美纳）30 例、甲磺酸奥希替尼片（泰瑞沙）20 例、克唑替尼胶囊 40 例（其中，ALK 基因融合阳性 22 例，ROS1 基因融合阳性 18 例）。各靶点人群接受相应靶向药物治疗的客观缓解率与既往药物临床试验客观缓解率范围基本相符，均达到了临床预期水平。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外辅助诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 临床基因扩增实验室及实验室操作人员资质应当严格遵循《医疗机构临床基因扩增管理办法》（卫办医政发〔2010〕194 号）。
3. 标本的容器、标本的处理以及检验过程中使用的材料的处理须符合《医疗废物管理条例》和《医疗卫生机构医疗废物管理办法》以及国家和地区的相关要求。
4. 所有化学药品都具有潜在危险性。只有经过培训且具有相应实验室技术的专业人员才能使用本试剂盒进行检测。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。使用过的试剂盒为医疗废弃物，应妥善处理。

【参考文献】

1. 国家卫生和计划生育委员会. 中国原发性肺癌诊疗规范(2015 年版)
2. Chen Z, et al. Non-small-cell lung cancers: a heterogeneous set of diseases. *Nat Rev Cancer*. 2014 Aug;14(8):535-46
3. NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology (NCCN Guidelines®). Non-Small Cell Lung Cancer (Version 5.2018)
4. Kohno T, et al. Beyond ALK-RET, ROS1 and other oncogene fusions in lung cancer. *Trans Lung Cancer Res*. 2015 Apr;4(2):156-64.
5. 中国临床肿瘤学会 (CSCO) 原发性肺癌诊疗指南 (2017.V1)
6. Blackhall F, Ross Camidge D, Shaw AT. Final results of the large-scale multinational trial PROFILE 1005: efficacy and safety of crizotinib in previously treated patients with advanced/metastatic ALK-positive non-small-cell lung cancer. *ESMO Open*. 2017 Aug 17;2(3): e000219.
7. Shaw AT, Ou SH, Bang YJ. Crizotinib in ROS1-rearranged non-small-cell lung cancer. *N Engl J Med*. 2014 Nov 20;371(21):1963-71.
8. Planchard D, et al. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously untreated BRAF V600E-mutant metastatic non-small-cell

lung cancer: an open-label, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2017 Oct;18(10):1307-1316

9. Tsao MS, et al. Prognostic and predictive importance of p53 and RAS for adjuvant chemotherapy in non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5240-7.

10. Slebos RJ, et al. K-ras oncogene activation as a prognostic marker in adenocarcinoma of the lung. *N Eng J Med*. 1990 Aug 30;323(9):561-5.

11. Roberts PJ, et al. KRAS mutation: should we test for it, and does it matter? *J Clin Oncol*. 2013 Mar 10;31(8):1112-21.

12. Mazières J, et al. Lung cancer that harbors an HER2 mutation: epidemiologic characteristics and therapeutic perspectives. *J Clin Oncol*. 2013 Jun 1;31(16):1997-2003

【基本信息】

名称：南京世和医疗器械有限公司

住所：南京市高开区新锦湖路 3 号-1 中丹产业园 A-7 楼

联系方式：4006362325

传真：02558465453

网址：www.geneseeq.com

E-mail: info@geneseeq.com

生产地址：南京高新技术产业开发区新锦湖路 3 号-1 中丹生态生命科学产业园一期 A 栋 7 楼 701、708-712，B 栋 18 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】

附表：本产品可检测突变类型列表

基因名称	外显子	突变	Cosmic ID	HGVS 格式
EGFR	18	p.G719A	COSM6239	NM_005228.3(EGFR):c. 2156G>C (p. Gly719Ala)
	18	p.G719C	COSM6253	NM_005228.3(EGFR):c. 2155G>T (p. Gly719Cys)
	18	p.G719S	COSM6252	NM_005228.3(EGFR):c. 2155G>A (p. Gly719Ser)
	19	19 外显子缺失*	不适用	19 号外显子缺失*
	20	T790M	COSM6240	NM_005228.3(EGFR):c.2369C>T (p. Thr790Met)
	21	L858R	COSM6224	NM_005228.3(EGFR):c.2573T>G (p. Leu858Arg)
	21	L861Q	COSM6213	NM_005228.3(EGFR):c.2582T>A (p. Leu861Gln)
ALK	NA	融合*	不适用	ALK 基因融合*
ROS1	NA	融合*	不适用	ROS1 基因融合*
BRAF	15	V600E	COSM476	NM_004333.4(BRAF):c.1799T>A (p. Val600Glu)
KRAS	2	G12A	COSM522	NM_033360.3 (KRAS):c.35G>C (p. Gly12Ala)
	2	G12C	COSM516	NM_033360.3 (KRAS):c.34G>T (p. Gly12Cys)
	2	G12D	COSM521	NM_033360.3 (KRAS):c.35G>A (p. Gly12Asp)
	2	G12S	COSM517	NM_033360.3 (KRAS):c.34G>A (p. Gly12Ser)
	2	G12R	COSM518	NM_033360.3 (KRAS):c.34G>C (p. Gly12Arg)
	2	G12V	COSM520	NM_033360.3 (KRAS):c.35G>T (p. Gly12Val)
	2	G13D	COSM532	NM_033360.3 (KRAS):c.38G>A (p. Gly13Aasp)
	2	G13C	COSM527	NM_033360.3 (KRAS):c.37G>T (p. Gly13Cys)
	2	G13R	COSM529	NM_033360.3 (KRAS):c.37G>C (p. Gly13Arg)
HER2	20	20 外显子插入*	不适用	20 号外显子插入*

*可检测多种相关突变或基因融合