

受理号：CSZ2100134

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：人 PDGFRA 基因 D842V 突变检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：北京泛生子基因科技有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

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.....	10
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

北京泛生子基因科技有限公司

二、申请人住所

北京市昌平区生命科学园生命园路 8 号院一区 11 号-1 至 5 层 101(2 层 201 室), 10 号-1 至 5 层 101(3 层 301 室, 303 室, 304 室)

三、生产地址

北京市昌平区回龙观镇中关村生命科学园生命园路 8 号院一区 11 号楼 2 层 201 室、北京市昌平区回龙观镇中关村生命科学园生命园路 8 号院一区 1 号楼 3 层 331 室

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：PDGFRA D842V 反应混合液、阳性对照品 (STD) 和空白对照品 (NTC)，详见表 1。

表1. 产品主要组成成分

名称	规格数量	主要成分
PDGFRA D842V 反应混合液	450 μ L \times 1 管	引物、探针、DNA 聚合酶、缓冲液、UNG、dUTP
阳性对照品 (STD)	20 μ L \times 1 管	PDGFRA D842V 突变的细胞系 DNA、PDGFRA D842V 野生型细胞系 DNA、TE Buffer
空白对照品 (NTC)	20 μ L \times 1 管	TE Buffer

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于定性检测胃肠间质瘤 (gastrointestinal stromal tumor, GIST) 患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋 (FFPE) 的组织样本中 PDGFRA 基因 18 号外显子 D842V 突变。

本试剂盒用于阿伐替尼片 (Avapritinib Tablets) 药物伴随诊断。

本试剂盒检测结果仅代表对相关位点的检测，为临床医生对胃肠间质瘤患者选择肿瘤靶向药物提供参考，不能作为患者

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

24 测试/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒基于实时荧光 PCR 平台 Taqman 探针与突变扩增阻滞系统（amplification refractory mutation system, ARMS）相结合的技术，检测 DNA 样本中的基因突变。利用特异性引物对突变靶序列进行 PCR 扩增，并利用 Taqman 探针对扩增产物进行检测。

本试剂盒设置了内参 Beta-globin 基因，其扩增情况能提示加入 DNA 模板的质量，监控每个反应孔内 DNA 扩增的情况，并加入了 dUTP 及 UNG 酶用于防污染。

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、探针、DNA 聚合酶混合液、UNG 酶、dUTP、突变型和野生型细胞系 DNA，这些原材料均为外购方式获得。引物、探针均为申请人自行设计，由合

成公司经合成、修饰和纯化方式获得。

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要求并经检验合格。

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、最低检测限参考品和重复性参考品。

阳性参考品3支，包括弱阳性参考品，中阳性参考品和强阳性参考品。由PDGFRA D842V阳性与阴性细胞系DNA样本混合制备而成。

阴性参考品3支，为PDGFRA D842V 阴性细胞系DNA样本、PDGFRA基因其他突变样本（PDGFRA D842Y质粒DNA与PDGFRA D842V 阴性细胞系DNA混合制备）和大肠杆菌DNA样本。

最低检测限参考品1支，为一定DNA浓度下PDGFRA D842V基因低突变比例的细胞系DNA样本；由PDGFRA D842V阳性与阴性细胞系DNA样本混合制备而成。

重复性参考品包括3支，包括中阳性重复性参考品、弱阳性重复性参考品和阴性重复性参考品。中阳性和弱阳性参考品由PDGFRA D842V阳性与阴性细胞系DNA样本混合制备而

成。阴性重复性参考品由PDGFRA D842V阴性细胞系DNA制备而成。

本试剂盒还同时设置了阳性对照品与空白对照品，其中阳性对照由野生型细胞系DNA和突变型细胞系DNA混合制备，用于检测过程中的试剂和仪器的质量控制。此外，每个样本均检测内参基因Beta-globin基因，用于结果判读及评估样本的质量。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒反应体系的研究包括引物探针浓度的确定、DNA聚合酶混合液用量的确定、UNG酶用量的确定、dUTP用量的确定、dUTP使用浓度的确定；对PCR反应条件的研究包括UNG酶处理时间、变性时间、退火温度及时间、循环数等的优化；对样本的用量以及样本保存时间进行了研究。

通过功能性实验，最终确定了最佳的反应体系。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

分析性能包括准确性、最低检测限、精密度、分析特异性（交叉反应、干扰试验）、核酸提取性能等

准确度研究中，使用 3 批成品试剂盒在所有适用机型上对企业参考品和临床样本进行检测，其中临床样本包含野生型样本和不同突变频率的胃肠间质瘤患者 FFPE 样本。阳性参考品、阴性参考品和临床样本的符合率均为 100%。

在最低检测限评估中，申请人使用 3 批成品试剂盒在所有适用机型上，采用不同 DNA 浓度、不同基因突变率的细胞系 DNA 样本，每个梯度的样本检测 20 次进行检出限的建立，然后使用真实检出限水平的临床样本进行检出限的验证。确认在 20ng 核酸总量水平下，突变序列所占百分率的最低检测限为 1%。在 1% 的突变序列百分率水平，本试剂盒检测的核酸总量最低检测限为 20ng。

在精密度研究中，申请人使用 3 批试剂盒在所有适用机型上对临床样本（包含：中阳性，弱阳性和阴性）和企业重复性参考品（中阳性和阴性）进行精密度研究，分别对日内/日间、批内/批间、室间、人员间、不同仪器之间的检测结果进行分析，结果显示中阳、弱阳性临床样本的结果均为相应的基因位点阳性；阴性临床样本结果均为阴性；中阳性临床样本 Ct 值变异系数均不大于 5.0%。

分析特异性研究包含交叉反应研究和干扰研究，交叉反应评价中，申请人选择与 PDGFRA D842V 突变型核酸序列相近、

易引起交叉反应的 PDGFRA D842Y 突变型进行验证。交叉反应研究为包含该突变位点的质粒和 PDGFRA D842Y 突变型临床样本，经验证上述样本与本产品不产生交叉反应。干扰试验结果显示内源性干扰物（2 mg/mL 血红蛋白、37 mM 甘油三酯、60 mg/mL 白蛋白），以及外源性干扰物（21.7mmol/L 乙醇、等体积石蜡、等体积福尔马林、35 mmol/L 二甲苯）均不干扰本试剂盒的检测结果。

申请人采用了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要求。

（四）阳性判断值或参考区间研究

阳性判断值的研究选取 111 例胃肠间质瘤患者 FFPE 样本，内参基因 Ct 值在 6~16 之间判定样本合格。采用受试者工作特征（ROC）曲线分析和约登指数确定试剂盒阳性判断值为 10，当 $\Delta Ct \leq 10$ 时为 D842V 突变阳性；当 $\Delta Ct > 10$ 时为 D842V 突变阴性。通过 352 例临床样本（用 7500 Fast Dx 和 cobas z 480 机型检测）和 448 例临床样本（用 CFX96 机型检测）对阳性判断值进行验证，结果显示，采用既定的阳性判断值可以正确区分样本的阴阳性。

（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：采用三批次试剂盒储存于规定储存条件下，分别在 0、6、10 和 14 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 $-20^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，可稳定保存 12 个月。

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

三、临床评价概述

该产品临床试验主要包括两部分，一是产品临床性能研究，二是产品伴随诊断临床意义研究。

第一部分临床性能研究，申请人在北京肿瘤医院、哈尔滨医科大学附属肿瘤医院、上海市第十人民医院、南通市肿瘤医院共 4 家机构完成了临床试验。采用试验用体外诊断试剂与临床参考方法 sanger 测序法进行比较研究试验，确认本产品的临床性能。入组人群包括：临床确诊为胃肠间质瘤（GIST）的患者，临床试验样本类型为福尔马林固定石蜡包埋的组织样本。临床试验共计入组病例 1474 例，其中对比方法检测阳性病例 75 例，阴性病例 1399 例。

试验结果显示,本产品与临床参考方法相比,临床样本检测的阳性符合率为 100.00% (95%CI:95.13%,100.00%),阴性符合率为 99.43% (95%CI:98.88%,99.71%),总符合率为 99.46% (95%CI:98.93%,99.72%)。结果显示两者检测结果之间的一致性具有统计学意义。

本产品与对比试剂检测不一致的样本采用数字 PCR 方法进行第三方验证。结合第三方验证结果,申请人对不一致结果的产生原因进行了详细分析。

第二部分伴随诊断临床意义研究,抗肿瘤药物阿伐替尼片已经在国内批准上市,支持阿伐替尼片上市的临床研究为一项全球多中心、单臂、开放标签的临床研究 BLU-285 治疗胃肠道间质瘤 (GIST) 或其他复发性和难治性实体瘤患者的 I 期研究 NAVIGATOR (BLU-285-1101) 以及一项评价阿伐替尼片用于中国不可切除的或转移性胃肠道间质瘤患者的 I/II 期临床研究 (CS3007-101/BLU-285-1105)。BLU-285-1101 研究,入组患者为确诊的胃肠道间质瘤患者,主要疗效终点指标是采用改良的 RECIST V1.1 标准通过独立影像学审查进行疾病评估的客观缓解率 (ORR),对于携带 PDGFRA 外显子 18 突变的不可切除的或转移性胃肠道间质瘤患者,在当地或中心实验室采用临床分析方法 (CTA) 进行确定。疗效评估基于 43 例患者,其中 38 例

患者为 PDGFRA 基因 D842V 突变，携带 PDGFRA 基因 D842V 突变患者的客观缓解率为 89.5% (95%CI: 75.2%, 97.1%); BLU-285-1105 研究，入组患者为不可切除的胃肠道间质瘤患者，主要疗效终点指标是采用改良的 RECIST V1.1 标准通过独立影像学审查进行疾病评估的客观缓解率 (ORR)，对于 PDGFRA 基因 D842V 突变检测，由当地或申办方指定实验室进行基因检测。疗效评估基于 28 例携带 PDGFRA 基因 D842V 突变的患者，客观缓解率为 78.6% (95%CI:59.0%,91.7%)。

申报产品采用桥接试验的方式确认产品临床意义，桥接试验样本来源为上述支持阿伐替尼片上市的两项临床研究，同时入组了部分未参与药物临床试验的阴性病例。其中 BLU-285-1101 研究能够用于桥接试验的阳性病例为 31 例，其中 30 例用于药效学分析，BLU-285-1105 研究能够用于桥接试验的阳性病例为 25 例，其中 23 例用于药效学分析，桥接试验还入组上述两个临床试验中剩余的阴性病例 110 例，入组了未参与药物临床试验的阴性病例 57 例。桥接试验在北京肿瘤医院、上海市第十人民医院、南通市肿瘤医院及药物临床试验中心实验室共 4 家机构完成。

试验结果显示，本产品与药物临床试验临床分析方法 (CTA) 相比，临床样本检测的阳性符合率为 95.45% (95%CI:

87.47%,98.44%) , 阴性符合率为 100.00% (95%CI:97.75%,100.00%) , 总符合率为 98.71% (95%CI: 96.28%,99.56%) 。显示两者检测结果之间的一致性具有统计学意义。桥接试验中试验体外诊断试剂检测 PDGFRA 基因 D842V 突变阳性病例客观缓解率为 92.5% (95%CI:81.9%,97.9%) , 与药物临床试验结果相比, 无显著的统计学差异。

综上, 临床试验结果显示, 本产品检测结果可用于抗肿瘤药物阿伐替尼片的伴随诊断, 产品满足临床需求。

四、产品受益风险判定

根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对产品进行风险分析。

(一) 受益评估

本产品适用于阿伐替尼片的伴随诊断, 为临床医生对胃肠间质瘤患者选择肿瘤靶向药物提供依据。检查结果仅供临床参考, 具体临床应用时, 临床医生必须结合病例实际情况判断。其临床应用的主要受益在于: 产品可以作为阿伐替尼片的伴随诊断试剂对靶向用药人群进行筛选, 可让 PDGFRA D842V 阳性的胃肠间质瘤患者获得及时的治疗。依据现有的临床试验结果显示, 该试剂盒检测 PDGFRA D842V 的阳性符合率为 100.00%、阴性符合率 99.43%、总符合率为 99.46%; 该试剂盒

所筛选患者人群的客观缓解率（ORR）为92.5%。

（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：本试剂盒用于定性检测胃肠间质瘤（GIST）患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织样本中PDGFRA 基因 18 号外显子 D842V 突变。

本试剂盒用于阿伐替尼片（Avapritinib Tablets）药物伴随诊断检测。本试剂盒检测结果仅代表对相关位点的检测，为临床医生对胃肠间质瘤患者选择肿瘤靶向药物提供参考，不能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体外诊断试剂产品注册，属于优先审批项目和境内同品种首个产品。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第 5 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 9 月 12 日

附件：产品说明书

人 PDGFRA 基因 D842V 突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：人 PDGFRA 基因 D842V 突变检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

24 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测胃肠间质瘤（gastrointestinal stromal tumor, GIST）患者经中性福尔马林固定的石蜡包埋（FFPE）的组织样本中 PDGFRA 基因 18 号外显子 D842V 突变。

本试剂盒用于阿伐替尼片（Avapritinib Tablets）药物的伴随诊断。本试剂盒检测结果仅代表对相关位点的检测，为临床医生对 GIST 患者选择肿瘤靶向药物提供参考，不能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。

胃肠间质瘤是胃肠道最常见的间叶源性肿瘤，在生物学行为上可从良性至恶性，免疫组化检测通常表达 CD117 和 DOG1 阳性，大多数病例具有 c-kit 或血小板源性生长因子受体 α （platelet derived growth factor receptor alpha, PDGFRA）基因活化突变^[1]，少数病例涉及其他分子改变，包括 SDHX、BRAF、NF1、K/N-RAS 及 PIK3CA 等基因突变^[2]。

PDGFRA 基因编码的蛋白全名为血小板源性生长因子受体 α ，是一种细胞表面受体酪氨酸激酶，PDGFRA 可以与其相应的配体 PDGF 结合后活化，再激活磷脂酰肌醇、cAMP 及多种蛋白质的磷酸化途径，调控细胞的分裂和增殖，当基因激活异常时，则会导致肿瘤的发生并促进肿瘤血管生成，PDGFRA 的突变与胃肠间质瘤密切相关^[3]。PDGFRA 最常见的突变是 18 号外显子上的 D842V 突变，《法国临床试验指南：胃肠道间质瘤的诊断，治疗与随访（2018）》明确指出，患者携带 PDGFRA 18 号外显子上的 D842V 突变无益处，该突变对伊马替尼耐药，推荐 GIST 患者进行 PDGFRA 突变检测^[4]；NCCN《软组织肉瘤临床实践指南（2019.v6）》将阿伐替尼片（Avapritinib Tablets）纳入指南，用于治疗携带 PDGFRA 18 号外显子突变的 GIST 患者，包括 PDGFRA D842V

突变的患者^[5]。阿伐替尼片于 2020 年 1 月在 FDA 完成上市审批，2023 年 2 月 3 日获 NMPA 常规批准上市，给携带 PDGFRA 18 号外显子突变（包括 PDGFRA D842V 突变）的 GIST 患者提供了新的治疗方案^[6]。本试剂盒采用 PCR 荧光探针法，对 GIST 患者样本中 PDGFRA 基因 D842V 突变进行定性检测，可以作为阿伐替尼片的伴随诊断试剂对靶向用药人群进行筛选。

【检验原理】

本试剂盒基于实时荧光 PCR 平台 Taqman 探针与突变扩增阻滞系统（amplification refractory mutation system, ARMS）相结合的技术，检测 DNA 样本中的基因突变。利用特异性引物对突变靶序列进行 PCR 扩增，并利用 Taqman 探针对扩增产物进行检测。

本试剂盒设置了内参 Beta-globin 基因，其扩增情况能提示加入 DNA 模板的质量，监控每个反应孔内 DNA 扩增的情况，并加入了 dUTP 及 UNG 酶用于防污染。

【主要组成成分】

名称	规格数量	主要成分
PDGFRA D842V 反应混合液	450 μ L \times 1 管	引物、探针、DNA 聚合酶、缓冲液、UNG、dUTP
阳性对照品（STD）	20 μ L \times 1 管	PDGFRA D842V 突变的细胞系 DNA、PDGFRA D842V 野生型细胞系 DNA、TE Buffer
空白对照品（NTC）	20 μ L \times 1 管	TE Buffer

注：不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

本试剂盒需要但未提供的试剂耗材：

1、核酸提取试剂盒：

核酸提取或纯化试剂 QIAamp® DSP DNA FFPE Tissue Kit（Qiagen 公司生产，备案号：国械备 20180418 号；货号 60404）

2、qPCR 96 孔板/条和光学膜：

- ① MicroAmp Fast Optical 96-Well Reaction Plate with Barcode（Thermo Fisher Scientific 公司生产，货号：4346906），MicroAmp™ Clear Adhesive Film（Thermo Fisher Scientific 公司生产，货号：4306311）
- ② LightCycler 480 Multiwell Plate 96（Roche 公司生产，货号：04729692001）

- ③ Bio-Rad Hard-Shell® Low-Profile Thin-Wall 96-Well Skirted PCR Plates (Bio-Rad 公司生产, 货号: HSP9601), Bio-Rad 光学膜 (Bio-Rad 公司生产, 货号: MSB1001)

【储存条件及有效期】

本试剂盒于-20℃±5℃避光保存, 有效期 12 个月。

试剂开瓶后-20℃±5℃避光保存, 建议 2 个月内使用; 试剂盒中组分可允许的反复冻融次数≤5 次。

生产日期和失效日期详见试剂盒包装标签。

【适用仪器】

1. 实时荧光定量 PCR 仪 Real-Time PCR Instrument 7500 Fast Dx (Life Technologies);
2. 全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 (罗氏诊断产品 (上海) 有限公司);
3. 实时定量 PCR 仪 CFX96 (伯乐生命医学产品 (上海) 有限公司)。

【样本要求】

1. 样本类型: 中性福尔马林固定、石蜡包埋的胃肠间质瘤组织样本中提取的人类基因组 DNA。
2. 样本采集、运输及保存: 按照病理学操作规范进行取材, 建议石蜡包埋病理切片样本的肿瘤细胞含量不低于 10%。石蜡包埋组织样本在常温下运输和保存, 常温下保存年限不超过 3 年。石蜡切片样本, 在常温下保存时间不超过 3 个月。
3. DNA 样本要求: 在核酸分离/纯化过程结束后, 应采用分光光度计对分离/纯化后的核酸储备液进行浓度、纯度检测, DNA 样本 OD260/OD280 应在 1.8~2.0 内, DNA 浓度不低于 10ng/μL。若提取后样本 OD260/OD280 不在 1.8~2.0 之间或浓度低于 10ng/μL, 建议重新提取。
4. DNA 样本保存: 提取得到的 DNA 应立即进行检测, 否则请于-20℃±5℃条件保存且避免多次冻融, 保存时间不超过 6 个月。

【检验方法】

打开包装后, 需要把试剂盒中的阳性对照品 (STD)、空白对照品 (NTC) 放入样本制备区。

1. 核酸提取:

按照核酸提取纯化试剂盒说明书进行操作, 提取的 DNA 浓度、纯度应符合 DNA 样本要求。

试剂盒中的空白对照品（NTC）需要参与提取过程。

2. 试剂准备：（试剂准备区）

室温下解冻反应混合液，快速离心 15 秒。在 96 孔板（或 8 联排）每个反应孔分别加入 18 μL PDGFRA D842V 反应混合液。

3. 样本准备：（样本制备区）

样本 DNA 稀释：将浓度大于 10ng/ μL 的样本 DNA 稀释至 10ng/ μL 。

加样：分别取 2 μL 浓度为 10ng/ μL 的待测样本 DNA、阳性对照品(STD) 和经过提取后的空白对照品（NTC）加入已加入 18 μL PDGFRA D842V 反应混合液的反应孔中。

注意：作为质量控制的重要环节，每次反应均需做阳性对照品和空白对照品。

4. PCR 扩增：（核酸扩增区）

将 PCR 96 孔板（或 8 联排）放入荧光定量 PCR 仪样本槽并记录放置顺序，按照表 1 设置仪器扩增程序进行扩增。仪器参数设定：

①使用 Real-Time RCR Instrument 7500 Fast Dx 探针选择设置 NONE；报告集团：FAM、ROX；淬灭集团：NONE；参比荧光：NONE。

②使用全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 检测时需新建荧光通道组合：FAM(465-510 nm)、ROX (540-610 nm)。

③实时定量 PCR 仪 CFX96 检测时荧光通道：FAM、ROX。

表 1 扩增程序

体系	总体积为 20 μL			
采集	PDGFRA D842V 基因-FAM 通道采集荧光信号，内参基因-ROX 通道采集荧光信号。两种信号同时收集。			
扩增程序	循环数	温度	时间	收集荧光信号
1	1 cycle	37 $^{\circ}\text{C}$	3 min	否
2	1 cycle	95 $^{\circ}\text{C}$	3 min	否
3	15 cycles	95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	否
		65 $^{\circ}\text{C}$	45 sec	否
4	25 cycles	95 $^{\circ}\text{C}$	15 sec	否
		60 $^{\circ}\text{C}$	45 sec	是

5. 结果分析

阈值设定：阈值线设定为指数增长期的起点。以上3种机型分别在设定条件下确定 FAM 通道和 ROX 通道 Ct 值（实时荧光定量 PCR 仪 Real-Time PCR Instrument 7500 Fast Dx 为 Ct 值，全自动荧光 PCR 分析仪 cobas z 480 为 Cp 值，实时定量 PCR 仪 CFX96 为 Cq 值，以下统称 Ct 值）。

注意：具体设置参数方法请参考不同仪器使用说明书。

计算 ΔCt 值： ΔCt 值=突变 Ct 值-内参 Ct 值（ $\Delta Ct=Ct_{FAM}-Ct_{ROX}$ ）。突变 Ct 值是指样本突变信号（FAM 信号）对应的 Ct 值；内参 Ct 值是指样本对应的内参信号（ROX 信号）的 Ct 值。

【阳性判断值】

1. 实验结果质控：

(1) 阳性对照品 ROX 通道 Ct 值范围为 6~16，FAM 通道 Ct 值 ≤ 18 ， $\Delta Ct \leq 10$ ，扩增曲线有明显指数增长期，否则实验结果无效。

(2) 空白对照品 FAM、ROX 通道应无明显扩增曲线。

(3) 待检样本 ROX 通道应有明显指数增长期的扩增曲线，且 Ct 值应在 6~16 之间，否则实验结果无效。

2. 结果判定：根据上述步骤确定 Ct 值与 ΔCt 值以后，若检测到 FAM 信号与 ROX 信号的 Ct 值之差 $\Delta Ct \leq 10$ ，检测结果判定为阳性；若 FAM 通道无明显扩增、Ct 值无显示或 $\Delta Ct > 10$ ，检测结果判定为阴性。

【检验结果的解释】

1. 每一份待检样本其内参 ROX 通道应呈现典型 S 型扩增曲线，Ct 值范围应为 6~16。若内参 ROX 无信号或 Ct > 16 提示加入的样本 DNA 有 PCR 抑制物或浓度不足，需要重复实验或重新提取 DNA。若 Ct < 6 ，提示加入的样本 DNA 过量，建议稀释 DNA 后重新进行实验。

2. 空白对照品若 FAM 通道有扩增，提示此次实验结果无效，应重新检测。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个体化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. 本试剂盒仅用于检测 PDGFRA D842V 突变，其他可能的突变形式（D842Y）不能检出。
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。
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. 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假阳性结果。
6. 该检测仅限于说明书规定的样本类型及检测系统。

【产品性能指标】

1. 外观：包装外观清洁、无泄漏、无破损；组分齐全；试剂瓶标签字迹清楚、无污染、无破损；试剂无漏液；各液体组分应澄清透明，无明显混浊、沉淀物或絮状物。
2. 准确度
 - (1) 阳性符合率：对 3 份（P1~P3）企业阳性参考品进行检测，结果为相应的基因位点阳性。
 - (2) 阴性符合率：对 3 份（N1~N3）企业阴性参考品进行检测，N1、N2 结果为相应的基因位点阴性，N3 结果为 FAM 和 ROX 通道无明显扩增。
 - (3) 临床样本准确度：对不同阳性水平的阳性样本和阴性样本，在三种适用机型上进行检测，准确性均为 100%。
3. 检测限
 - (1) 对 20 ng DNA 中突变频率为 1%的 1 份（L）企业检测限参考品进行检测，重复检测 3 次，结果为相应的基因位点阳性。
 - (2) 使用 PDGFRA D842V 阳性和阴性细胞系提取的 DNA 制备不同突变频率的样本，进行最低检测限研究；使用 PDGFRA D842V 阳性和阴性临床样本提取的 DNA 制备突变频率为 1%样本，进行最低检测限验证。结果表明：在 20ng 核酸总量水平下可检测突变频率低至 1%的 PDGFRA D842V 阳性样本。

4. 精密度

(1) 参考品精密度：对 3 份 (R1~R3) 企业重复性参考品进行检测，用同一批次试剂盒重复检测 10 次，R1、R2 的结果均为相应的基因位点阳性，R1 计算其 Ct 值变异系数 (CV, %)，CV 不大于 5%；R3 的结果均为阴性。

(2) 临床样本精密度：使用不同批次的试剂盒，在三种适用机型上分别检验中阳、弱阳、阴性临床样本，对日内/间、操作者间、仪器间、实验室间精密度进行评价，结果表明：中阳和弱阳临床样本的结果均为相应的基因位点阳性，阴性临床样本结果均为阴性；中阳临床样本计算其 Ct 值变异系数 (CV, %)，CV 均不大于 5%。

5. 分析特异性

(1) 干扰物质：干扰实验显示，样本中含有以下干扰物：血红蛋白 (2mg/mL)、甘油三酯 (37mM)、乙醇 (21.7mmol/L)、白蛋白 (60 mg/mL)、石蜡 (等体积)、福尔马林 (等体积)、二甲苯 (35 mmol/L)，对检测结果无影响。

(2) 交叉反应：检测可能引起非特异性反应的企业阴性参考品 (N2: PDGFRA D842Y 突变) 和临床样本 (PDGFRA D842Y 突变)，检测结果均为阴性，未发生交叉反应，试剂盒检测特异性良好。

6. 临床试验结果

(1) 临床性能研究：在 4 家临床机构共入组 1532 例有效性样本，以 sanger 测序作为对比方法，考核试剂与对比方法之间的一致性分析显示，阳性符合率为 100.00%、阴性符合率 99.45%、总符合率为 99.48%。

(2) 伴随诊断用途确认：在 3 家临床机构及 1 家中心实验室进行。①与 CTA 检测结果的一致性：共入组 233 例有效性样本，考核试剂与 CTA 之间的一致性分析显示，阳性符合率为 95.45%、阴性符合率 100.00%、总符合率为 98.71%；②药物疗效等效性分析：考核试剂检测后共 53 例疗效可评估患者样本，采用与药物临床试验一致的主要疗效终点指标对考核试剂所选择患者人群进行药物疗效评估，并进行考核试剂与 CTA 检测所选择患者人群药物疗效的等效性分析。考核试剂的客观缓解率 (ORR) 为 92.5%，药物临床试验的 ORR 为 84.8%，对两者的 ORR 进行卡方检

验，结果显示两者无统计学差异。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书，本产品仅用于体外诊断。
2. 由于样本本身的来源、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 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. 应该严格区分阳性对照和反应试剂的使用，防止交叉污染，造成假阳性。
4. 实验时注意防止外源性 DNA 对试剂的污染，注意先加完样本 DNA 后再进行阳性对照的操作。建议在制备反应试剂和添加 DNA 模板时，使用单独、专用的移液器和滤芯枪头。进行反应试剂制备的地点应当与添加 DNA 模板的地点相隔离。
5. 实验完毕后按标准 PCR 操作间的规范处理工作台和移液器。
6. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194 号）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】

标识	含义	标识	含义
	表明该储运包装件在运输时应竖直向上		表明运输包装件内装易碎物品，搬运时应小心轻放
	表明该运输包装件应保持的温度范围		表明该运输包装件怕雨淋，避免潮湿保持干燥
	代表体外诊断医疗器械		

【参考文献】

1. 周岩冰. 胃肠道间质瘤的诊断与治疗现状[J]. 中华普通外科杂志, 2017, 32(7): 549-552.
2. Wada R, Aral H, Kure S, et al. "Wild type" GIST: Clinico-pathological features and clinical practice[J]. Pathol Int, 2016, 66(8): 431-437.

3. Qian Y, Yu L, Zhang X H, et al. Genetic Polymorphism on the Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Platelet-derived Growth Factor Receptor (PDGFR) Kinase Inhibitors[J]. Current drug metabolism, 2018, 19(14):1168.
4. Landi B, et al. Gastrointestinal stromal tumours (GISTs): French Intergroup Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatments and follow-up (SNFGE, FFCD, GERCOR, UNICANCER, SFCD, SFED, SFRO). Dig Liver Dis (2019).
5. NCCN Clinical Practice guidelines in Oncology:Soft Tissue Sarcoma (Version6.2019) .
6. 《阿伐替尼片说明书》

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京泛生子基因科技有限公司

住所：北京市昌平区生命科学园生命园路8号院一区11号-1至5层101（2层201室），10号-1至5层101（3层301室，303室，304室）

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：北京市昌平区回龙观镇中关村生命科学园生命园路8号院一区11号楼2层201室、北京市昌平区回龙观镇中关村生命科学园生命园路8号院一区1号楼3层331室

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】