

## 【产品名称】

通用名称：EGFR 基因检测试剂盒（荧光原位杂交法）

【包装规格】10 人份/盒、20 人份/盒。

## 【预期用途】

该产品用于定性检测确诊为非小细胞型肺癌患者的石蜡包埋肺癌组织切片中的 EGFR 基因扩增。该产品未与具体药物联合进行临床试验，仅针对靶基因突变的检测性能进行验证。上皮细胞生长因子受体（EGFR）是一种酪氨酸激酶（TK）受体，正常情况下表达于上皮细胞表面。40~80%的非小细胞型肺癌患者细胞存在 EGFR 扩增突变，临床试验显示这两种变异存在一定的重叠概率，且临床用药敏感性存在差异。

其中 EGFR 突变与肿瘤对酪氨酸激酶抑制剂（TKIs）的敏感度有重要关系（突变患者的用药敏感度优于扩增患者），所以相关的临床指南要求在使用 EGFR-TKI 之前必须进行 EGFR 突变检测。而对于 EGFR 野生型患者可以继续进行 EGFR 基因扩增的检测，以筛选突变检测所不能覆盖的部分存在基因扩增的潜在受益人群。

本品以确诊为非小细胞型肺癌患者的石蜡包埋肺癌组织切片为检测对象，用荧光原位杂交的方法检测非小细胞型肺癌细胞中是否存在 EGFR 基因的扩增。本产品检测结果仅代表对 EGFR 基因的检测结果，为临床医生个体化用药提供参考。

## 【检验原理】

荧光原位杂交是一项在体外直接观察细胞中特定核酸的技术。根据碱基互补配对的原则，特定的 DNA 序列与细胞内的目标序列互补结合。由于探针带有荧光，在合适的激发光照射下，杂交探针及目标 DNA 能够在荧光显微镜下被清楚地观察到。本试剂盒提供 2 种探针，分别为 7 号染色体着丝粒区段同源探针和 EGFR 基因位点探针。杂交完成后单个细胞内相应区段的数量可以被清晰地显示。杂交包括以下几个步骤：首先需要将石蜡包埋的组织切片进行预处理；然后将 DNA 变性为单链，再与探针杂交；杂交完成后，通过一系列的洗涤，将多余的未结合的探针洗去，再用 DAPI（4, 6-二脒基-2-苯吡啶盐酸）将细胞核复染成蓝色；最后用荧光显微镜在合适的滤镜下观察探针及 DAPI 发出的荧光的信号。

## 【主要组成成分】

组分名称	规格		数量	主要成分
	10 人份/盒	20 人份/盒		
EGFR 杂交液	100 $\mu$ L/管	200 $\mu$ L/管	1 管	CSP7 探针和 GSPEGFR，甲酰胺、SSC、硫酸葡聚糖
DAPI 复染剂	100 $\mu$ L/管	200 $\mu$ L/管	1 管	DAPI 和抗褪色剂

## 以下仪器及材料需自备：

< 制片 > 防脱载玻片；恒温箱。< 预处理 > 二甲苯；无水乙醇；纯化水；胃蛋白酶（1:10000, Sigma）—胃蛋白酶反应液（4mg/mL 胃蛋白酶 0.02mol/L HCL）；0.2g 胃蛋白酶 + 49ml 纯化水 + 1ml 1mol/L HCL；20 $\times$ SSC（上海生工）；圆形玻璃染色缸；恒温水浴锅（95 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C）。< 样品和探针同时变性 > 18 $\times$ 18mm 盖玻片（上海生工）、镊子、橡皮胶（rubber cement）、平板加热器、杂交盒、恒温水浴锅（37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C）。< 杂交后洗涤及复染 > 无水乙醇；NP-40（上海生工）；20 $\times$ SSC（上海生工）；圆形玻璃染色缸；恒温水浴锅（37 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C）；22 $\times$ 22mm 盖玻片；

洗液 I（2 $\times$ SSC）：36mL 纯化水+4mL 20 $\times$ SSC，总体积 40mL；

洗液 II（0.1% NP-40/2 $\times$ SSC）：36mL 纯化水+4mL 20 $\times$ SSC+40 $\mu$ L NP-40，总体积 40mL；

【储存条件及有效期】-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 避光干燥保存；有效期 12 个月。

以下环境或条件下，试剂性能无变化：①25 $^{\circ}$ C 光照度 20000Lux 环境下保存 2 小时，547Lux 环境下保存 24 小时。②37 $^{\circ}$ C 避光保存 3 天；③25 $^{\circ}$ C 开瓶保存 10 小时；④模拟运输环境（低温）5 天内；⑤反复冻融 5 次。一般，随着保存时间延长和/或温度升高，信号强度下降，灵敏度降低，检测背景的加深，信号判读开始出现偶然性

【适用仪器】各种荧光显微镜，适合 DAPI（367/452）、Green（496/520）、Orange（552/576）观察的滤片。

## 【样本要求】

1. 适用标本类型：石蜡包埋的组织样本切片
2. 标本的固定：从取材到固定间隔不超过 1 小时，固定的时间以 6-48 小时为宜
3. 固定液类型：10% 中性福尔马林固定液
4. 切片厚度：3~5 $\mu$ m 之间
5. 载玻片：多聚赖氨酸处理
6. 保存和运送：石蜡包埋组织切片样本应室温防尘保存和运送，保存期为 12 个月

## 【检验方法】

### 1 玻片预处理

- 1.1 玻片放入 65 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 恒温箱中烤片过夜；
- 1.2 取出玻片，将其放入室温二甲苯中 15 分钟；
- 1.3 取出玻片，再将其放入另一缸室温二甲苯中 15 分钟；
- 1.4 取出玻片，再将其放入室温无水乙醇中 10 分钟；
- 1.5 取出玻片，再将其放入室温 100% 乙醇、90% 乙醇、70% 乙醇各 3 分钟；
- 1.6 取出玻片，再将其放入室温去离子水中 3 分钟，用无尘纸中吸取多余水分；
- 1.7 取出玻片，再将其放入 100 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 的去离子水中煮片 25 分钟（切片水平放置于容器中，样本面朝上）；
- 1.8 取出玻片，室温晾干；
- 1.9 将玻片正面朝上平置，在样本区域滴加适量的胃蛋白酶反应液，消化 5~15 分钟；
- 1.10 将多余液体甩去，玻片放入室温 2 $\times$ SSC 中 5 分钟；
- 1.11 取出玻片，再将其放入另一缸室温 2 $\times$ SSC 中 5 分钟；
- 1.12 取出玻片，再将其依次放入室温 70%，90%，100% 梯度乙醇脱水各 3 分钟；
- 1.13 取出玻片，室温晾干。

**关键点：**胃蛋白酶的反应时间需要通过预试验进行确定。可以使用同批制备的样本片按所述方法进行预试验，通常以 5 分钟为间隔时间。例如，分别测试消化时间为 5 分钟、10 分钟和 15 分钟，完成“玻片预处理”后，可以在明场下，使用 10 $\times$ 或 20 $\times$ 物镜观察组织消化状态；或者直接进行 DAPI 复染，进行消化状态判断。

### 2 样品和探针同时变性（避光操作）

- 2.1 从-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 冰箱中取出杂交液，震荡混匀，瞬时离心；
- 2.2 加 10 $\mu$ L 的杂交液到杂交区域，迅速盖上 18 $\times$ 18mm 盖玻片，轻压使杂交液均匀分布，避免产生气泡；
- 2.3 用橡皮胶沿盖玻片边缘封片，完全覆盖盖玻片和载玻片接触的部位；
- 2.4 将玻片放入杂交仪中，湿润原位杂交仪湿度条，插入湿条，盖上杂交仪上盖，设置“Denat&Hyb”程序，变性 85 $^{\circ}$ C 5 分钟，杂交 37 $^{\circ}$ C 10~18 小时。（若无杂交仪，可使用替代仪

器，如恒温热台进行变性，电热烘箱或水浴锅进行杂交，需注意温度准确及保持杂交湿度。

### 3 杂交后洗涤及复染（避光操作）

3.1 洗涤前 30 分钟，将配好的洗液 I、洗液 II，放入 37±1℃的水浴中，测量以确保温度合适；

3.2 关闭杂交仪电源，将玻片取出，轻轻撕去橡皮胶，移去盖玻片（若盖玻片难以去除，可以将其放入洗液 I 中微微摇晃，以利于其脱落；

3.3 玻片放入 37±1℃洗液 I（2×SSC）中 10 分钟；

3.4 取出玻片，再将其放入 37±1℃洗液 II（0.1% NP-40×2×SSC）中 5 分钟；

3.5 取出玻片，室温 70%乙醇中 3 分钟；

3.6 取出玻片，暗处自然干燥玻片；

3.7 室温，滴加 10 μL DAPI 复染剂到 22×22mm 的盖玻片，载玻片目标区域朝下，轻放于盖玻片上，轻压，避免产生气泡，在暗处存放，待观察。

**注意事项：**①上述所列试剂均在圆形染色缸中配制（每种试剂体积均为 40mL），每个染色缸最多可放入 5 片切片。非室温溶液，在操作开始前需提前预热反应试剂至指定温度。在洗涤过程中，可间隔 2~3 分钟轻轻晃动染色缸，提高洗涤效果。②杂交后样本在 4℃避光至少可以保存 7 天。

### 4 结果分析

相关荧光和 DAPI 需用合适的滤块观察。其中，CSP7 探针显示绿色信号；GSPEGFR 探针为红色信号。

4.1 使用合适的滤镜，在 40×物镜下寻找，在 100×物镜下计数；

4.2 调整合适的焦距，对信号和背景有明确的概念；信号点因位于细胞内；当细胞外存在荧光信号点时，要注意与细胞内信号点区分，最好能避开该区域进行计数；

4.3 扫视几个肿瘤细胞区域，选择至少 4 个有很好核分界的区域，要求细胞核边界完整，DAPI 染色均匀、核无重叠，CSP7 探针（绿色信号点）信号清晰；

4.4 从选择区域的左上角开始分析，从左到右扫视，观察多个视野；

4.5 组织计数的要求；

4.6 只计数肿瘤组织（在 FISH 检测前，使用 HE 染色片进行对照观察）

4.7 避免在坏死区域及核边界不清的区域计数

4.8 需要主观辨别的核不计数

4.9 跳过信号弱及没有特定信号或高背景的信号点

4.10 转至 100×物镜，调整焦距，在核的不同层次找到所有信号点；

4.11 在每个核内计数信号点；调焦找到每个核内的所有信号点，计数一个区域内的两种信号，只计数每种颜色有 1 个或多个 FISH 信号的，没有信号或只有一种颜色信号的核不计数；记录观察到的细胞总数（信号正常及异常）；

4.12 计数方法

在 5 个清晰的肿瘤区域，共计数 50 个肿瘤细胞核内 GSPEGFR（红色）和 CSP7（绿色）信号，分别计数单个细胞核内 GSPEGFR 和 CSP7 的信号数。计数时，要特别注意信号断裂、成对或是成簇情况。当两个或三个信号由线状相连或是相邻（间距小于信号点直径）时作为一个信号。记录最大信号数目为 15，当 >15 时，记录为 15。

### 5 质量控制

5.1 内对照：杂交的组织细胞中 75% 的细胞核显示出双色信号时，方视为试验成功。可以将信号正常的细胞作为内对照，对杂交特异性进行监控。

5.2 外对照：每次检测都必须同时做质控片，质控片必须和病例样本一同操作，来对比操作的过程。对于一个新试剂盒，必须先做一个质控片。质控片为 FISH 检测阳性和阴性的标本片，可以购买商品化对照片或者选择已知的对照样本按照说明书所述方法进行制片。质控片结果分析方法同上，计数 50 个细胞中各信号点的数目。荧光信号计数结果必须和质控来源相同，如果质控片无法达到分析的要求，则该批实验结果不可以被分析。

5.3 对于临床样品，如果杂交信号不明确，该次试验被认为是无法判断结果；同样地，如果可用于分析的细胞数目不足，该次试验也被认为信息不足。

### 6、试验结果的判定

统计 GSPEGFR 信号 ≥4 个的细胞占统计总细胞的百分比，再计算所有细胞 GSPEGFR 信号总数与 CSP7 信号数的比率。

当如下情况时：

a. ≥40% 的细胞出现 ≥4 个 EGFR 信号；

b. GSPEGFR/CSP7（红色/绿色）≥2，同时，用于计数的核中 CSP7 信号 ≥2；

c. ≥10% 的细胞出现 ≥4 个 EGFR 信号簇；

d. ≥10% 的细胞出现 >15 个 EGFR 信号；

若满足情况 a、或 b、或 c、或 d 时判定为 FISH 阳性（EGFR 基因扩增）；不满足上述情况判定为 FISH 阴性（EGFR 基因无扩增）。

#### 【参考范围】

通过临床标本的验证，最终确定本试剂盒的判定标准。

#### 【检验结果的解释】

研究表明，在非小细胞肺癌样本中 EGFR 基因扩增表现形式多样，基于 FISH 检测，常表现为 6 种信号形式：在约 60% 的核中 EGFR 信号表现为相对松散、超过 20 个拷贝的信号类型，扩增子表现为均染区（图 1a）；在 10%~15% 核中 EGFR 信号表现为 4-10 拷贝的基因信号（图 1b）；在 15%-20% 核中扩增子包含 CSP7 序列，表现为共扩增基因簇（图 1c）；约 5% 核中出现非典型的相对内对照细胞内信号大且明亮的基因信号簇（图 1d）；约 1% 核内出现双微体（图 1e）；5% 核内出现染色体非整倍情况，表现为 ≥10% 核内出现 ≥15 EGFR 信号（图 1f）。模式图如图 1 示：

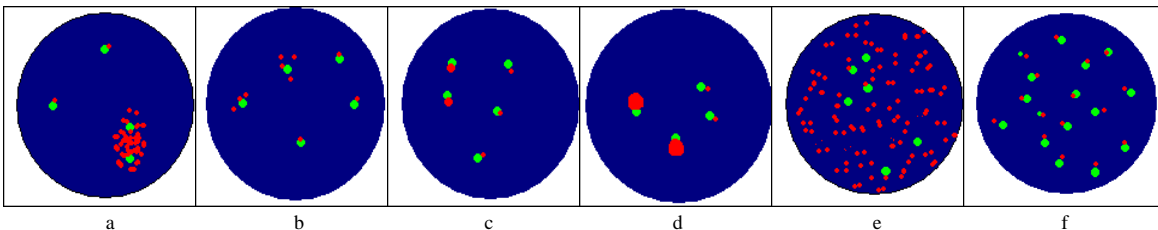


图 1 EGFR 基因扩增形式

#### 示例：样本检测

样本检测前可以使用人外周血细胞培养物制备的细胞片进行探针准确性验证（可选）。临床质控使用已知的对照样本制片，按说明书所述与未知样本同时进行样本预处理，进行变性和杂交，最后经杂交后洗涤和复染进行结果分析。图 2 示人外周血细胞片中的中期染色体检测结果，图 3 示临床质控片的检测结果，图 4 和 5 示未知样本检测结果。

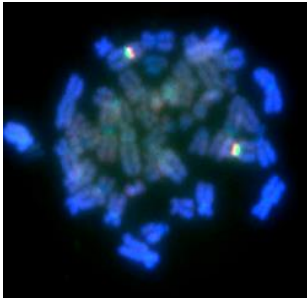


图 2

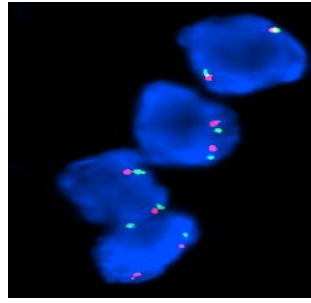


图 3

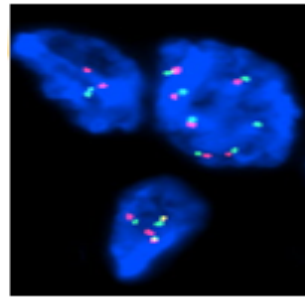


图 4

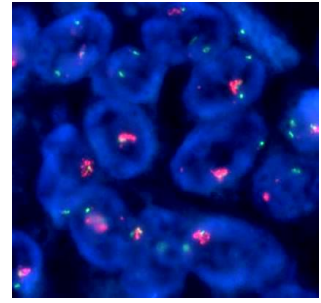


图 5

### 结果

图 2 所示的人外周血细胞杂交结果正常，荧光信号仅出现在预期的靶区域，未见交叉杂交，试剂质量合格，可以用于样本检测。

图 3 所示临床质控片检测结果，观察 5 个肿瘤区域，GSP EGFR/CSP7 (红色/绿色) = 1，符合“FISH 阴性”判断标准。试验结果符合预期，可以进行未知样本的结果判断。

图 4 示未知样本的检测结果，观察 5 个肿瘤区域，≥40%的细胞出现≥4 个 EGFR 信号，GSP EGFR/CSP7 (红色/绿色) < 2 符合 EGFR 高多体性扩增，符合“FISH 阳性”判断标准。报告格式为：样本检测结果为 EGFR 基因扩增。

图 5 示未知样本的检测结果，观察 5 个肿瘤区域，≥10%的细胞出现>15 个 EGFR 信号，符合“FISH 阳性”判断标准。报告格式为：样本检测结果为 EGFR 基因扩增。

### 【检验方法的局限性】

本试剂盒只用于体外诊断，适用于福尔马林固定的石蜡包埋人类非小细胞型肺癌组织中期细胞核中的 7 号染色体和 EGFR 基因的鉴别和定量，不应使用其他类型的标本和固定剂。样本及制片质量都会影响本试剂盒的检测结果。本试剂盒的检出结果仅供临床参考，假如试验结果与临床所见不符，应由病理医生和临床医生进行会诊，不能单独作为确诊或治疗的依据。

### 【产品性能指标】

分析性能评估结果表明，作为固定剂的中性福尔马林和用于包埋的石蜡不会干扰试验结果。通过临床试验与同类检测试剂进行比较，本试剂盒的阳性符合率 99.4%、阴性符合率 99.8%、总符合率 99.6%。

### 【注意事项】

1. 本试剂盒只用于体外检测。
2. 实验前请仔细阅读本说明书。
3. 实验室管理应严格按照细胞遗传学实验室的管理规范，实验人员必须进行专业基础和技能培训，熟悉荧光显微镜的操作。
4. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，试剂准备需生物安全柜，实验过程中穿工作服，带一次性手套，使用白卸管移液器。
5. 对每次实验进行质量控制。
6. 配制试剂除特别说明外，均使用纯水配制。
7. DAPI 复染剂包含有 DAPI 和对苯二胺，DAPI 有潜在致突变作用，避免直接和皮肤或者粘膜接触；对苯二胺是已知的皮肤致敏源和可能的呼吸道致敏源，避免吸入，食入或与皮肤接触；探针及变性液中含有甲醛是一种致畸物，操作过程中需注意防护，避免与皮肤及粘膜接触。如果试剂接触到眼睛或皮肤，请立即用大量水冲洗，如有不适应状需及时就医。
8. 荧光素在光照下易淬灭，所有含荧光的试剂都需要避光。所有步骤中包含荧光试剂的操作都需要避光；高倍镜长时间观察会发生荧光衰减，导致荧光图像反差减弱，可以减少激发光强度，从而减缓荧光衰减；观察计数时切勿长时间照射同一视野，以防止荧光淬灭。
9. 溶液、水浴、烤箱的温度非常关键，需使用合格温度计进行校准，使用前须确定温度准确。
10. 有毒有害试剂处理需按照相应程序处理。
11. 在观察信号时应根据情况随时调节显微镜焦距，准确观察位于细胞核不同平面上的信号以免遗漏。
12. 本产品提供的试剂不含有源或动物源性物质。

### 【参考文献】

1. M Varella-Garcia, J Diebold, D A Eberhard, K Geenen, A Hirschmann, M Kockx, I Nagelmeier, J Ruschhoff, M Schmitt, S Arbogast, F Cappuzzo. EGFR fluorescence in situ hybridization assay: guidelines for application to non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Pathology*. 2009; 62:970-977.
2. Marileila Varella-Garcia. Stratification of non-small cell lung cancer patients for therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors: the EGFR fluorescence in situ hybridization assay. *Diagnostic Pathology*. 2006; 1:19.
3. Rebecca Suk Heist and David Christiani. EGFR-targeted therapies in lung cancer: predictors of response and toxicity. *Pharmacogenomics*. 2009 January; 10(1):59-68.

### 【基本信息】

注册人生产企业名称：广州安必平医药科技股份有限公司  
 住所：广州市黄埔区科信街 2 号  
 联系方式：电话：020-32299997 传真：020-32290284  
 售后服务单位名称：广州安必平医药科技股份有限公司  
 生产地址：广州市黄埔区科信街 2 号  
 生产许可证编号：粤食药监械生产许 20111993 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20173400640

【说明书核准日期及修改日期】核准日期：2017 年 4 月 18 日

修改日期：2022 年 4 月 18 日