肿瘤个体化治疗相关基因突变

检测试剂技术审查指导原则

（第二次征求意见稿）

二零一三年十一月

目 录

[一、前言 2](#_Toc372029980)

[二、适用范围 3](#_Toc372029981)

[三、注册申报资料要求 4](#_Toc372029982)

[(一)综述资料 4](#_Toc372029983)

[(二)产品说明书 5](#_Toc372029984)

[(三)拟定产品标准及编制说明 12](#_Toc372029985)

[(四)注册检测 13](#_Toc372029986)

[(五)主要原材料研究资料 13](#_Toc372029987)

[(六)主要生产工艺及反应体系的研究资料 18](#_Toc372029988)

[(七)分析性能评估资料 19](#_Toc372029989)

[(八)参考值（参考范围）确定资料 24](#_Toc372029990)

[(九)稳定性研究资料 25](#_Toc372029991)

[(十)临床试验研究 26](#_Toc372029992)

[四、名词解释 32](#_Toc372029993)

[五、参考文献 33](#_Toc372029994)

**肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂**

**技术审查指导原则（征求意见稿）**

# 前言

本指导原则旨在指导注册申请人对肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂注册申报资料的准备及撰写，同时也为技术审评部门对注册申报资料的技术审评提供参考。

本指导原则是针对肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂的一般要求，申请人应依据产品的具体特性确定其中内容是否适用，若不适用，需具体阐述理由及相应的科学依据，并依据产品的具体特性对注册申报资料的内容进行充实和细化。

本指导原则是对申请人和审查人员的指导性文件，但不包括注册审批所涉及的行政事项，亦不作为法规强制执行，如果有能够满足相关法规要求的其他方法，也可以采用，但需要详细阐明理由，并对其科学合理性进行验证，提供详细的研究资料和验证资料，相关人员应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则。

本指导原则是在现行法规和标准体系以及当前认知水平下制定的，随着法规和标准的不断完善，以及科学技术的不断发展，本指导原则相关内容也将适时进行调整。

# 适用范围

　　本文所述肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂是指利用基于聚合酶链式反应（PCR）方法的核酸检测技术，以肿瘤个体化治疗相关的突变基因为检测目标，对人体样本（包括组织、体液等）提取的核酸组分中的目标序列进行体外检测的试剂。

本文所指基因突变的类型包括置换、插入、缺失、基因重排、拷贝数异常及RNA表达异常等广义的基因突变。

本指导原则的技术要求是基于荧光探针PCR方法确立的，对于高分辨熔解曲线PCR方法、Luminex平台或核酸检测芯片等其他基于PCR的分子生物学检测技术，可能部分要求不完全适用或本文所述技术指标不够全面，申请人可以根据实际产品特性对不适用部分做适当修订或补充需要的评价和验证，但需阐述不适用的理由，并验证其科学合理性，同时确认性能评价的充分性。本文所涉及试剂的方法学不包括荧光原位杂交（Fluorescence in situ Hybridization，FISH）、核酸序列测定、染色体核型分析及免疫组化技术等用于肿瘤个体化治疗指导的其他方法学。本指导原则适用于进行首次注册申报和相关许可事项变更的产品。

# 注册申报资料要求

## 综述资料

综述资料主要包括产品预期用途、产品描述、有关生物安全性的说明、研究结果的总结评价以及同类产品上市情况介绍等内容，其中同类产品上市情况介绍部分应着重从方法学及不同基因突变类型检出能力等方面写明拟申报产品与目前市场上已获批准的同类产品之间的主要区别。若尚无同品种批准上市，则应详细论述作为检测靶标的突变基因与个体化治疗方案的相关性，说明理论依据。

提交的资料应符合《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》（国食药监械〔2007〕229号）（以下简称《办法》）和《体外诊断试剂注册申报资料基本要求》（国食药监械〔2007〕609号）的相关要求。

## 产品说明书

说明书承载了产品预期用途、标本采集及处理、实验方法、检测结果解释以及注意事项等重要信息，是指导实验室工作人员正确操作、临床医生针对检验结果给出合理医学解释的重要依据，因此，产品说明书是体外诊断试剂注册申报最重要的文件之一。产品说明书的格式应符合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，境外试剂的中文说明书除格式要求外，其内容应尽量保持与原文说明书的一致性，翻译力求准确且符合中文表达习惯。产品说明书的所有内容均应与申请人提交的注册申报资料中的相关研究结果保持一致，如某些内容引用自参考文献，则应以规范格式对此内容进行标注，并单独列明文献的相关信息。

结合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，下面对肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂说明书的重点内容进行详细说明，以指导注册申报人员更合理地完成说明书编制。需要强调的是，产品说明书内容应与申请人前期完成的分析性能评估、稳定性研究、临床实验研究等技术资料完全一致。

1. 【预期用途】

应至少包括以下几部分内容：

1. 临床背景的介绍，包括相关适用人群特征、肿瘤的组织类型、适用的样本类型、待测靶基因序列的特征及选择依据，靶基因及其表达蛋白在恶性肿瘤发生、发展过程中可能起到的作用，相关药物或其他治疗技术及其作用机理、与待测突变位点可能存在的关系等。如未与具体治疗方案联合进行相应的临床验证，以上关于靶基因突变与肿瘤疾病及治疗方案的相关性描述仅仅来自诊疗指南、书籍、文献等资料，则在说明书中应注明参考资料的出处，预期用途的相关表述中不应涉及具体药物产品（商品）名称、生产企业信息等，并注明该产品未与具体药物联合进行临床验证，仅针对靶基因突变的检测性能进行了验证；若已将试剂盒与具体药品联合进行了相关临床验证，可在此明确具体药物，并在说明书中对相关的临床研究情况进行简介。
2. 试剂盒用于特定肿瘤患者人群，通过检测人体样本提取的核酸组分中是否存在靶基因突变，对临床上特定肿瘤患者的个体化治疗提供参考意见。肿瘤的类别及适用样本类型应结合实际的临床研究完成情况进行确认。
3. 明确说明该试剂盒仅用于对特定肿瘤患者靶基因序列的检测，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、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。
4. 【检验原理】
5. 对试剂盒检测能够覆盖的所有突变位点或突变类型进行详细描述（靶序列长度、基因座位、突变类型及相关特征等），对引物及探针设计、不同样品反应管组合、对照品设置及荧光信号检测原理等进行逐项介绍。
6. 核酸提取方法、原理等。
7. 试剂盒技术原理的详细介绍，建议结合适当图示进行说明。如添加了相关的防污染组分（如UDG/UNG 酶等），也应对其作用机理作适当介绍。
8. 【主要组成成份】
9. 详细说明试剂盒内各组分的名称、数量、内容物、比例或浓度、稳定性等信息，阴性/阳性对照品（或质控品）可能含有生物源性物质的组分，应说明其生物学来源、活性及其他特性；说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。
10. 试剂盒中不包含但对该项检测必须的组分，企业应列出相关试剂/耗材的名称、注册证号（如有）及其他必要的信息。
11. 如果试剂盒中不包含用于核酸分离/纯化的试剂组分，则应在此注明经验证后推荐配合使用的商品化核酸分离/纯化试剂盒的生产企业、产品名称以及该产品的医疗器械注册证号等详细信息。
12. 【储存条件及有效期】

试剂盒的效期稳定性、开瓶稳定性、复溶稳定性、运输稳定性、冻融次数要求等。

1. 【适用仪器】

所有适用的仪器型号，并提供与仪器有关的重要信息以指导用户操作。

1. 【样本要求】

重点明确以下内容：

1. 对适用的样本类型作详细介绍，包括样本来源及取材要求、样本处理方式（如组织样本的固定及包埋方式）、肿瘤细胞比例等。

样本的取材及处理方式等若有通用的技术规范或指南，则应遵循，并在此处引用。

1. 样本处理及保存：核酸提取前样本的预处理、保存条件及期限（短期、长期）、运输条件等。
2. 在提取过程结束后，可采用适当方法（如分光光度计法）对提取后的核酸储备液进行浓度、纯度检测，并依据性能验证结果在此给出用于扩增试验的核酸溶液浓度范围要求。举例：扩增反应终体系中需要50ng的DNA量，而在终体系中需加入25μl的DNA储备液，则在DNA提取完成后应将DNA储备液的浓度调整至2ng/μl的浓度。

如提取后的核酸储备液浓度范围不符合要求，应重新取材或扩大样本量再进行核酸提取。

1. 操作过程中各种制备液的稳定性要求，如各类混合液（Mix）、DNA/RNA储备液、反应终体系等(常温/冷藏/冷冻/冻融次数限制等）。
2. 【检验方法】

详细说明实验操作的各个步骤，包括：

1. 试剂配制方法、注意事项。
2. 详述核酸提取的条件、步骤及注意事项。对照品（质控品）应参与样本核酸的平行提取（如有必要），以对核酸提取环节进行合理的质量控制。
3. 扩增反应前准备：各组分加样体积、顺序、相关注意事项等。
4. 逆转录过程（如涉及）的温度和时间设置、PCR各阶段的温度、时间设置、循环数设置及相关注意事项。
5. 仪器设置：特殊参数，待测基因、内标和外标的荧光通道选择等。
6. 【参考值（参考范围）】

参考值（参考范围）的描述包括基线的确定方法和循环阈值（Ct值）的要求。除Ct值要求外，建议结合是否出现典型S形曲线对结果进行判断。

1. 【检验结果的解释】

　　结合阳性对照、阴性对照以及样本管中靶基因和内标的检测结果（Ct值），对所有可能出现的结果组合及相应的解释进行详述。如存在检测灰区，应对灰区结果的处理方式一并详述。

1. 【检验方法的局限性】
2. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者个性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。
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. 明确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. 【产品性能指标】

详述以下性能指标：

1. 对相应国家参考品（如有）检测的符合情况。
2. 最低检测限：试剂盒能够覆盖的所有突变靶序列的最低检出浓度，重点考虑原始模板中突变基因的百分率和扩增终体系中核酸浓度两个因素对最低检测限的影响。简单介绍最低检测限的确定方法以及对最低检测限验证所采用的靶序列的信息。
3. 企业内部阳性/阴性参考品符合率，阳性/阴性参考品的组成、来源、浓度梯度设置以及评价标准等信息。
4. 精密度：精密度参考品的组成、来源、浓度梯度要求及评价标准。建议以列表的方式表示不同浓度精密度参考品的检测结果（变异系数）。
5. 分析特异性

①野生型验证：应采用不同浓度的野生型核酸样本进行验证，其结果应均为阴性。

②试剂盒内交叉反应：如考核试剂包括对多个突变位点的检测，则应对该试剂盒覆盖范围内的所有突变类型间进行交叉反应验证。

③序列相近或具有一定同源性的其他较常见突变或野生型基因序列间的交叉反应验证。

④潜在干扰物质验证。

如果经验证发现某些序列与靶序列的交叉反应出现阳性结果，则应该对存在交叉反应的核酸序列及浓度进行验证并在产品说明书中表明这种假阳性发生的可能，做出相关的提示。

1. 对比试验研究（如有）：简要介绍参比试剂（方法）的信息、所采用的统计学方法及统计分析结果。
2. 【注意事项】

应至少包括以下内容：

1. 如该产品含有人源或动物源性物质，应给出具有潜在感染性的警告。
2. 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）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。

## 拟定产品标准及编制说明

拟定产品标准应符合《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》和《体外诊断试剂注册申报资料基本要求》的相关规定。另外，对于国产试剂，应参考《中国生物制品规程》（2000年版），将申报产品的主要原材料、生产工艺及半成品检定等内容作为附录附于标准正文后，并在正文的“产品分类”项中引出该附录内容。附录中应将待测靶基因的基因位点、引物/探针设计及来源、参考品设置、来源及验证情况、各种酶的来源、特性及验证等重点内容予以明确。

肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂的注册检测应主要包括以下性能指标：物理性状、试剂盒内阴/阳性对照品（质控品）的Ct值要求（包括内标）、阴/阳性参考品符合率、精密度、最低检测限等。阳性参考品主要考察对试剂盒覆盖范围内不同突变基因的检测符合性，阴性参考品则重点对申报试剂的分析特异性进行验证。

如果申报试剂已有相应的国家/行业标准发布，则企业标准的要求不得低于国家/行业标准的要求。

## 注册检测

根据《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》的要求，首次申请注册的第三类产品应该在国家食品药品监督管理局认可的、具有相应承检范围的医疗器械检测机构进行连续3个生产批次样品的注册检测。对于已经有国家标准品的检测项目，在注册检测时应采用相应的国家标准品进行,对于目前尚无国家标准品的项目，生产企业应建立自己的参考品体系并提供相应的内部参考品。

## 主要原材料研究资料

应提供主要原材料如引物、探针、企业参考品的选择与来源、制备过程、质量分析和质控标准等相关研究资料。若主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定，并提交工艺验证报告；如主要原材料购自其他供货商，应提供的资料包括：对物料供应商审核的相关资料、供货方提供的质量标准、出厂检定报告，以及该原材料到货后的质量检验资料。

1. 核酸分离/纯化组分（如有）的主要组成、原理介绍及相关的验证资料。
2. PCR和/或RT-PCR组分的主要原料（包括引物、探针、各种酶及其他主要原料）的选择、制备、质量标准及实验研究资料，主要包括以下内容：
3. 脱氧三磷酸核苷（dNTP）

核酸的组成成分，包括：dATP、dUTP、dGTP、dCTP和dTTP，对纯度、浓度、保存稳定性等的验证资料。

1. 引物

由一定数量的dNTP构成的特定序列，通常采用DNA合成仪人工合成，合成后经聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）或其他适宜方法纯化。需提供对分子量、纯度、稳定性、功能性实验等的验证资料。如为外购，应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如PAGE电泳结果或高效液相色谱法（HPLC）分析图谱。

1. 探针

特定的带有示踪物（标记物）的已知核酸片段（寡聚核苷酸片段），能与互补核酸序列退火杂交，用于特定核酸序列的探测。合成后经聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）或其他适宜方法纯化，在5-端(和/或3-端)进行标记，并经HPLC或其他适宜方法纯化，纯度应达到HPLC纯。应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如HPLC分析图谱，应对探针的分子量及标记的荧光素进行核实，并进行功能性试验验证。

1. 酶

DNA聚合酶，应具有DNA聚合酶活性，无核酸内切酶活性，具热稳定性，如：94℃保温1小时后仍保持50%活性；尿嘧啶糖基化酶（UNG），具有尿嘧啶糖基化活性，无核酸外切酶及核酸内切酶活性，应对酶活性有合理验证；逆转录酶，具逆转录酶活性，无核酸内切酶活性。

1. 核酸类检测试剂的包装材料和耗材应无DNase和RNase污染。
2. 企业内部参考品：应详细说明有关企业内部参考品的原料选择、制备、定值过程等试验资料。具体要求如下：
3. 阳性参考品

试剂盒（分型或不分型）所能覆盖的所有突变位点均应设置相应的阳性参考品，每个突变位点设置至少三个突变百分率梯度，其中需包括至少一份弱阳性参考品。阳性参考品的突变形式及浓度需经过金标准方法或已上市同类分型试剂的确认。

如申报试剂用于DNA样本的检测，则阳性参考品可以采用临床样本提取的DNA储备液、相应质粒或细胞系（如有）作为原料。如申报试剂用于RNA样本的检测，阳性参考品可以采用临床样本提取的RNA储备液、相应RNA冻干粉或模拟缺陷病毒（假病毒）的形式；如覆盖突变位点过多，可以对其中部分突变位点采用质粒的形式，但不能全部采用质粒，需包括部分突变类型（申请人自行确定其代表性）RNA为模板的阳性参考品以对逆转录（RT）过程进行监控。

1. 阴性参考品

可采用经确认无相应靶突变序列的野生型DNA储存液。

1. 检测限参考品

检测限参考品的原料要求参考阳性参考品，需包括所有的突变类型。在进行最低检测限性能评估时，应设置多个梯度，主要从扩增反应终体系核酸浓度和突变序列所占百分率两个方面进行评价，建议采用95%（n≥20）的阳性检出率作为最低检测限确定的标准。当设置检测限参考品时，可以仅设置一个浓度水平，该水平可略高于95%的阳性检出率水平，而设置为100%检出，应明确参考品中靶核酸浓度水平和突变百分率。

1. 精密度参考品

精密度参考品原料要求参考阳性参考品，需包括阴性、弱阳性、中或强阳性三个浓度水平的精密度验证，中/强阳性精密度参考品可不必包括所有突变类型，以常见突变类型（申请人自行确定其代表性）为主，但弱阳性参考品需包括所有突变位点。

1. 试剂盒内对照品（质控品）

试剂盒的质控体系通过设置各种试剂盒对照品来实现，质控体系需考虑对样本核酸提取、配液及加样、试剂及仪器性能、扩增反应抑制物（管内抑制）、交叉污染、靶核酸降解等因素可能造成的假阴性或假阳性结果进行合理的质量控制。所有阳性对照品的核酸性质应与待测样本的靶核酸性质一致，如同为DNA或RNA。对照品可采用质粒、假病毒或临床样本的核酸提取液等进行配置。申报资料应对试剂盒对照品有关原料选择、制备、定值过程等试验资料详细说明。申请人应视申报产品具体情况设置合理的试剂盒对照品（质控品），试剂盒质控体系主要考虑以下几方面要求。

* 1. 阳性对照品（质控品）

建议对每个样品反应管设置至少一份阳性对照品（质控品），阳性对照品应参与样本核酸的平行提取（如有必要），以对样本提取、试剂及仪器性能、扩增反应过程等环节进行质量控制，企业应对各种阳性对照（质控）品的Ct值做出明确的范围要求。如样本反应管内可以覆盖多种突变序列的检测（分型或不分型），相应的阳性对照管可以不必涉及所有突变类型，但应选择较常见突变序列或理论上较难测得的突变序列作为阳性对照。

* 1. 内对照（内标）

内对照（内标）可以对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制，尤其是靶核酸为RNA、用于基因重排或基因表达异常等检测目的时，可以采用管家基因或与靶基因浓度水平相当的其他基因序列作为相应的内对照（内标）。申请人应对内对照（内标）的引物、探针和模板浓度做精确验证，既要保证内标荧光通道呈明显的阳性曲线又要尽量降低对靶基因检测造成的抑制而导致假阴性。

* 1. 阴性对照

阴性对照可以是含有野生型核酸序列的核酸溶液，也可以是空白对照，以对可能存在的交叉污染进行假阳性结果的质控。阴性对照品应参与样本核酸的平行提取。

由于临床标本多为经过复杂处理的病理切片或组织，其中核酸的完整性容易被破坏，从而影响后续实验结果，造成假阴性的可能性。因此，除上述对照品外，申报试剂的反应体系中应充分考虑对核酸提取环节的质量控制，比如，设置专门的质控管对管家基因或其他源于人类基因组DNA的靶序列进行扩增，以对核酸提取的质量及效率进行评估。

## 主要生产工艺及反应体系的研究资料

生产工艺及反应体系的研究资料应能对反应体系涉及到的基本内容，如临床样本用量、试剂用量、反应条件、质控体系设置、Ct（临界）值确定等，提供确切的依据，配制工作液的各种原材料及其配比应符合要求，原材料应混合均匀，配制过程应对pH、电导率、离子浓度等关键参数进行有效控制。主要包括以下内容：

* + 1. 主要生产工艺介绍，可以图表方式表示。
    2. 反应原理介绍。
    3. 基因位点选择、(RT)-PCR方法学特性介绍。
    4. 确定最佳(RT)-PCR反应体系的研究资料，包括酶浓度、引物/探针浓度、dNTP浓度、阳离子浓度等。
    5. 确定逆转录过程（如涉及）的温度和时间的研究资料，PCR反应各阶段温度、时间及循环数的研究资料。
    6. 对于基线阈值（threshold）和阈值循环数（Ct）确定的研究资料。
    7. 不同适用机型的反应条件如果有差异应分别详述。
    8. 如申报产品包含核酸提取试剂，应提交对核酸提取过程进行工艺优化的研究资料。

## 分析性能评估资料

企业应提交在产品研制阶段对试剂盒进行的所有性能验证的研究资料，包括具体研究方法、内控标准、实验数据、统计分析等详细资料。建议着重对以下分析性能进行研究。

若试剂用于RNA样本检测，则在性能评估中需对所有突变位点均采用RNA样本，从而对逆转录过程进行验证。

1. 样本核酸提取

样本核酸的提取主要有以下目的：富集靶核酸浓度、保证靶核酸序列的完整性、增加PCR模板溶液均一性、去除PCR抑制物，样本核酸提取是决定后续核酸扩增过程成败的要素之一。尤其是石蜡包埋组织样本在福尔马林固定过程中，会使样品中的核酸与核酸之间，核酸与蛋白之间发生交联，并且样本在不当的保存条件下容易造成核酸的片段化或降解，增加了核酸提取的难度。因此，无论申报产品是否含有核酸分离/纯化的组分，企业都应对核酸提取的环节做充分的验证。除最大量分离出目的核酸外，还应有相应的纯化步骤，尽可能去除PCR抑制物。常见的核酸分离纯化均有其优势和不足，申请人应结合申报产品的特性，合理选择核酸分离/纯化试剂，并提供详细的验证资料。

1. 阳性/阴性参考品符合率

各水平、各突变位点的阳性参考品均应按要求检出阳性，考虑到浓度梯度的不同，应对各水平阳性参考品设置相应Ct值的限制；阴性参考品在各个引物探针组合的检测条件下均应检出为阴性；如有野生型参考品的设置，在其相应的引物探针组合下检测应为阳性。

1. 最低检测限

建议采用95%（n≥20）的阳性检出率作为最低检测限确定的标准，扩增反应终体系中的突变序列百分率和总核酸浓度两个因素对最低检测限的影响较大，终体系中突变序列的百分率越高、所含的DNA（RNA）量越多，则越容易检出。因此，试剂盒最低检测限主要考虑以下两种情形。

* 1. 在扩增反应终体系特定核酸浓度下，突变序列所占百分率的最低检测限。

采用野生型临床样本和较高突变百分率的临床样本提取的核酸储备液进行混合，确定扩增反应终体系中的核酸浓度，采用合理的试验方法（如深测序）对混合后样本中突变序列所占百分率进行确认，并逐渐调整野生型和突变型核酸储备液的比例以得到含不同突变序列百分率的混合液。如上述方法不易实现，也可采用含相应突变类型的质粒与野生型基因组DNA（或野生型质粒）混合的方法来制备相应的混合液。对各份混合液进行不少于20次的重复检测，确定95%阳性检出率水平，作为在固定的核酸浓度条件下，可以检测到的最低的突变序列百分率。

举例：在50ng/40ul水平，可以达到95%阳性检出率的最低突变序列百分率为10%。

* 1. 在特定突变序列百分率下，反应终体系中核酸浓度的最低检测限。

采用合理的实验方法确定待测样本中的突变序列所占的百分率，或采用突变型质粒与野生型基因组DNA（或野生型质粒）按一定比例混合（如固定在10%的水平），再逐级稀释成不同核酸浓度样本，分别对各梯度浓度样本进行不少于20次的重复检测，确定95%阳性检出率的最低DNA（RNA）浓度。

举例：在10%的突变序列百分率水平，40ul扩增反应终体系中，DNA浓度的最低检测限为50ng/40ul。

* 1. 建议评价肿瘤细胞比例、DNA（RNA）降解等因素对最低检测限可能造成的影响。

1. 分析特异性
2. 野生型验证：采用不同浓度的野生型核酸样本进行验证，结果应为阴性。
3. 交叉反应，对于此类产品的交叉反应验证主要考虑以下几方面情形：

①申报试剂所覆盖的全部突变类型间的交叉反应；

②核酸序列具有同源性、易引起交叉反应的野生型或其它突变类型间的交叉反应。

申请人应提供所有用于交叉反应验证的突变或野生型序列、序列确认和浓度选择等试验资料。有关交叉反应验证的信息应以列表的方式在产品说明书的【产品性能指标】项中有所体现。

1. 干扰物质

①申请人应根据试剂盒所采用的样本类型，确定潜在的干扰物质。

②用于干扰试验的样本，靶基因浓度应至少包含弱阳性，而不应仅选择强阳性样本，使用医学相关水平的干扰物质进行验证。此外，建议申请人同时在每种干扰物质的潜在最大浓度(“最差条件”)条件下同样进行评价。

有关干扰物质的研究结果亦应总结于产品说明书的【产品性能指标】项下。

1. 精密度

测量精密度的评价方法并无统一的标准可依，可根据不同产品特征或企业的研究习惯进行，前提是必须保证研究的科学合理性。具体实验方法可以参考国际或国内有关体外诊断产品性能评估的文件进行。企业应对每项精密度指标的评价标准做出合理要求，如标准差或变异系数的范围等。针对本类产品的精密度评价主要包括以下要求。

* 1. 对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除申报试剂（包括提取组分）本身的影响外，还应对PCR分析仪、操作者、地点等要素进行相关的验证。
  2. 合理的精密度评价周期，例如：为期至少20天的连续检测，每天至少由2人完成不少于2次的完整检测，从而对批内/批间、日内/日间以及不同操作者之间的精密度进行综合评价。如有条件，申请人应选择不同的实验室进行重复实验以对室间精密度进行评价。
  3. 用于精密度评价的参考品应至少包括3个水平:

①阴性参考品：待测靶核酸浓度低于最低检测限或为零浓度，建议选用背景值较高的阴性样本，阴性符合率应为100%（n≥20）。

②弱阳性参考品：待测靶核酸浓度略高于试剂盒的最低检测限，阳性检出率应达到100%（n≥20）。注：弱阳性参考品需包括所有的突变位点，如果待测物靶核酸为RNA，则弱阳性精密度参考品中应至少部分典型突变位点的原料为RNA，如RNA干粉或相应的假病毒。

③高浓度参考品：待测靶核酸呈中到强阳性的浓度，阳性检出率为100%且CV≤15%（n≥20）。注：如果试剂盒可以覆盖多个突变位点的检测，该参考品可以设置为对全部突变位点进行精密度验证，也可以选择其中部分突变位点进行验证，但应至少包含常见突变序列或理论上较难测得的突变序列。

1. 其他需注意问题

对于适用多个机型的产品，应提供如产品说明书【适用机型】项中所列的所有型号仪器的性能评估资料。若试剂盒适用的样本类型不止一种，如既包含石蜡包埋组织切片亦包含冷冻组织切片或血液样本等，则需对所有样本类型的适用性进行评估，并提交评估资料。

## 参考值（参考范围）确定资料

对于此类试剂，参考值确定资料主要是指Ct值的确认资料，建议申请人采用受试者工作特征（ROC）曲线的方式对申报产品用于结果判断的临界值予以确认。

## 稳定性研究资料

稳定性研究资料主要涉及两部分内容，申报试剂的稳定性和适用样本的稳定性研究。前者主要包括实时稳定性（有效期）、开瓶稳定性、复溶稳定性、运输稳定性及冻融次数限制等研究，申请人可根据实际需要选择合理的稳定性研究方案。稳定性研究资料应包括研究方法的确定依据、具体的实施方案、详细的研究数据以及结论。对于实时稳定性研究，应提供至少三批样品在实际储存条件下保存至成品有效期后的研究资料。

另外，样本稳定性的研究对于实验的成败也至关重要。特别是当使用标本类型包括组织标本时，肿瘤组织标本经过特殊处理后其核酸序列的完整性容易遭到破坏，因此应提供对样本保存条件、保存时间等方面的详细研究资料。样本稳定性研究主要包括核酸提取前样本稳定性和提取后核酸在储备液中的稳定性两方面。在合理的温度范围内选择多个温度点（应至少包括范围的上限和下限温度），每间隔一定的时间段即对储存样本进行分析验证，从而确认不同类型样本的稳定性。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

试剂稳定性和样本稳定性两部分内容的研究结果均应在说明书【储存条件及有效期】和【样本要求】两项中进行详细说明。

## 临床试验研究

对于国内外尚无同类产品被批准上市或无充足资料证明其临床预期用途的新型肿瘤相关基因突变，相关检测试剂的临床研究不能单纯采用对比试验的方法，而应将试剂盒临床研究纳入相关药物的临床研究或临床应用中，通过对特定的肿瘤病人进行治疗前后的跟踪随访，以临床对于患者个体化治疗方案及有效性的综合判断为金标准，评价此类试剂用于指导肿瘤个体化治疗的临床性能。其中，有关诊断试剂临床研究的临床试验资料应符合《办法》、《体外诊断试剂注册申报资料基本要求》（国食药监械〔2007〕609号）以及《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求。

对于已有同类产品上市的、基因突变类型与肿瘤个体化治疗方案的相关性已经得到确认的产品，则申请人既可采用试剂盒检测与相关药物治疗相结合对特定的肿瘤病人进行治疗前后的跟踪临床研究的方法，亦可在充分结合相关的病例信息的情况下，采用考核试剂与参比方法进行对比试验的研究方法，对考核试剂的临床应用有效性进行评价。

以下要求均针对采用对比试验方法的临床研究提出。

* 1. 参比方法的选择可以考虑以下几方面：
  2. 如已有同类产品上市，其临床研究可以选择境内已批准上市、临床普遍认为质量较好的同类产品作为参比试剂，采用拟申报产品（以下称考核试剂）与之进行对比试验研究，证明本品与已上市产品等效或优于已上市产品。但应充分考虑已上市同类试剂的突变位点选择、靶序列选择、最低检测限等特性，确保考核试剂与申报试剂具有明确可比性。
  3. 申请人亦可采用核酸序列测定方法作为此类试剂临床试验研究的参比方法，验证考核试剂检测结果与核酸序列测定（测序）结果之间的一致性情况。临床研究报告中应对选用的测序方法做详细介绍，并对委托测序服务的机构（如涉及）资质和选择依据作简要说明或提供相关资料。

申请人应提供以下关于测序部分的详细试验资料，需有临床试验单位签章确认。

①测序方法原理、测序仪型号、测序试剂及消耗品的相关信息。

②测序方法所用引物相关信息，如基因区段选择，对分子量、纯度、功能性实验等的验证资料。引物设计应合理涵盖考核试剂扩增的靶核酸区段、位点、及所有突变类型。

③对所选测序方法的分析性能进行充分的验证，尤其是最低检测限的确认，并与申报试剂的相关性能进行适当比对分析。

④测序方法应对申报试剂设计的所有检测位点建立相应的阳性质控品。建议对各位点不同的检测浓度进行验证。建立合理的阴性质控品对分析特异性进行质控。

⑤提交采用测序方法对临床试验中每例样本测序的图谱及结果分析资料。

* 1. 此外，在充分考虑检测结果具有明确可比性的前提下，也可以选择荧光原位杂交（FISH）或免疫组化等染色体或蛋白水平的检测技术作为参比方法，但考虑到检测结果之间不具有直接的可比性，建议对所有阳性病例采用其他分子生物学技术（如核酸序列测定）对结果予以确认。测序部分资料的提交参考上一条要求。
  2. 临床研究单位的选择

建议申请人在选择临床单位时，应在国内不同区域选择临床单位，尽量使各单位的临床样本有一定的区域代表性；临床研究单位应具有分子病理诊断和分子生物学方法检测的优势，实验操作人员应有足够的时间熟悉检测系统的各环节（仪器、试剂、质控及操作程序等），熟悉评价方案。在整个实验中，考核试剂和参比方法都应处于有效的质量控制下，最大限度保证试验数据的准确性及可重复性。

* 1. 临床试验方案

临床试验实施前，研究人员应从流行病学、统计学、临床医学、检验医学等多方面考虑，设计科学合理的临床研究方案。各临床研究机构的方案设置应基本一致，且保证在整个临床试验过程中遵循预定的方案实施，不可随意改动。整个试验过程应在临床研究机构的实验室内并由本实验室的技术人员操作完成，申报单位的技术人员除进行必要的技术指导外，不得随意干涉实验进程，尤其是数据收集过程。

试验方案中应确定严格的病例纳入/排除标准，任何已经入选的病例再被排除出临床研究都应记录在案并明确说明原因。在试验操作过程中和判定试验结果时应采用盲法以保证试验结果的客观性。各研究单位选用的参比试剂应完全一致，以便进行合理的统计学分析。临床方案中还应明确确证试剂及方法。另外，考核试剂适用的样本类型、可检测的基因突变类型不应超越参比试剂的相应检测要求，若此种情况发生，则应选择其他合理方法对额外的样本类型和基因突变类型进行验证。

* 1. 病例选择及阳性病例比例

临床试验应以肿瘤患者为研究对象，其中试剂盒规定范围的每种突变类型均应有一定量的阳性病例。对于阴性病例的选择，也应考虑到交叉反应的需要，以从临床角度考察其分析特异性。阴/阳性病例均应覆盖所有适用的肿瘤类型。若产品适用于多种样本类型，则应对所有样本类型均进行临床验证。

* 1. 统计学分析

对临床试验结果的统计应选择合适的统计方法，如检测结果一致性分析、受试者工作特征（ROC）曲线分析、阴性/阳性符合率等。对于本类产品对比实验的等效性研究，常选择交叉四格表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行四格表χ2检验或kappa检验以验证两种试剂定性结果的一致性，统计分析应可以证明两种方法的检测结果有无明显统计学差异。在临床研究方案中应明确统计检验假设，即评价考核试剂与参比试剂是否等效的标准。

* 1. 结果差异样本的验证

在数据收集过程中，对于两种方法检测结果不一致的样本，应采用“金标准”方法或临床上普遍认为质量较好的第三种同类试剂进行复核，同时结合患者的临床病情对差异原因及可能结果进行分析。

* 1. 临床试验总结报告撰写

根据《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求，临床试验报告应该对试验的整体设计及各个关键点给予清晰、完整的阐述，应该对整个临床试验实施过程、结果分析、结论等进行条理分明的描述，并应包括必要的基础数据和统计分析方法。建议在临床总结报告中对以下内容进行详述。

1. 临床试验总体设计及方案描述

①临床试验的整体管理情况、临床研究单位选择、临床主要研究人员简介等基本情况介绍。

②病例纳入/排除标准、不同年龄段人群的预期选择例数及标准。

③样本类型，样本的收集、处理及保存等。

④统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。

1. 具体的临床试验情况

①临床研究所用产品的名称、批号、有效期及所用机型等信息，以及对比试验产品的注册情况。

②对各研究单位的病例数、年龄分布情况进行综合分析，建议以列表或图示方式给出具体例数及百分比。

③质量控制，试验人员培训、仪器日常维护、质控品运行情况，对检测精密度、质控品测量值的抽查结果评估。

④具体试验过程，样本检测、数据收集、样本长期保存、结果不一致样本的校验等。

1. 统计学分析

①数据预处理、差异数据的重新检测或第三方验证以及是否纳入最终数据统计、对异常值或缺失值的处理、研究过程中是否涉及对方案的修改。

②阳性符合率、阴性符合率、总体符合率。

③以交叉四格表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行四格表χ2检验或kappa检验以验证两种试剂定性结果的一致性。

另外考虑到对不同样本类型以及不同年龄段人群的检测结果可能存在一定差异，故建议对不同样本类型及不同年龄段人群分别进行统计分析，以对考核试剂的临床性能进行综合分析。

1. 讨论和结论

对总体结果进行总结性描述并简要分析试验结果，对本次临床研究有无特别说明，最后得出临床试验结论。

# 名词解释

1. **聚合酶链式反应 polymerase chain reaction, PCR：**

聚合酶链式反应或多聚酶链式反应是一种对特定的DNA或RNA片段在体外进行快速扩增的方法。由变性-退火-延伸三个基本反应步骤构成。

1. **杂交 hybridization**

具有一定同源序列的两条核酸单链（DNA或RNA）可以通过氢键的方式，按碱基互补配对原则相结合。

1. **荧光探针PCR**

在PCR过程中利用荧光染料释放的荧光能量的变化直接反映出PCR扩增产物量的变化，并通过对荧光的采集和分析以达到对原始模板量进行分析的PCR。

1. **分析特异性 analytical specificity**

测量程序只测量被测量物的能力。分析特异性用于描述检测程序在样本中有其他物质存在时只测量被测量物的能力。通常以一个被评估的潜在干扰物清单来描述，并给出在特定医学相关浓度值水平的分析干扰程度。

注：潜在干扰物包括干扰物和交叉反应物。

1. **精密度 precision**

在规定条件下，相互独立的测试结果之间的一致程度。精密度的程度是用统计学方法得到的测量不精密度的数字形式表示，如标准差（SD）和变异系数（CV）。

1. **检测限 detection limit, limit of detection**

样品中以一定概率可被声明与零有差异的被测测量的最低值。

1. **阈值循环数 cycle threshold, Ct**

实时监测扩增过程中，反应管内的荧光信号到达指数扩增时经历的循环周期数。主要的计算方式是以扩增过程前3到15个循环的荧光值的10倍标准差为阈值，当荧光值超过阈值时的循环数则为阈值循环数（Ct）。

1. **突变 mutation**

是细胞中DNA核苷酸序列发生了稳定的可遗传的改变。

1. **内标 internal control**

在同一反应管中与靶序列共同扩增的一段非靶序列分子，其目的是鉴别仪器故障、试剂因素、聚合酶活性因素或样本中存在抑制物等造成的结果不理想的原因。

# 参考文献

1. 《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》,（国食药监械〔2007〕229号）,2007年4月19日
2. 《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》,（国食药监械〔2007〕240号）,2007年4月28日
3. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》,（国食药监械〔2007〕240号）,2007年4月28日
4. Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection or Detection and Differentiation of Influenza Viruses. CDRH, FDA, USA, February 15, 2008
5. 彭文伟.传染病学,第五版.人民卫生出版社，2001
6. 李金明.实时荧光PCR技术,第一版.人民军医出版社, 2007
7. Robert F. Weaver. Molecular Biology, 4th Edition, 2008
8. 刘艳芳,张勇建,苏明.临床病毒学检验.军事医学科学出版社,2009
9. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS), MM3-A2, Vol26 No.8, ISBN 1-56238-596-8
10. Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. NCCLS, MM6-A, Vol. 23 No.28. ISBN 1-56238-508-9
11. Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS), MM17-A, Vol.28 No.9, ISBN 1-56238-661-1
12. 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础,第二版.上海科学技术文献出版社,2007
13. 《中国生物制品规程》（2000年版），化学工业出版社
14. T.斯特罗恩，A.P.里德 编著. 孙开来 主译. 人类分子遗传学,第三版. 北京：科学出版社,2007