附件

运动神经元存活基因1（*SMN1*）检测试剂

注册审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对脊髓性肌萎缩症相关基因运动神经元存活基因1（*SMN1*）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提供参考。

本指导原则是对*SMN1*基因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。

本指导原则是供注册申请人和技术审评人员使用的指导性文件，但不包括审评审批所涉及的行政事项，亦不作为法规强制执行，应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则。如果有能够满足相关法规要求的其他方法，也可以采用，但是需要提供详细的研究和验证资料。

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，随着法规和标准的不断完善，以及科学技术的不断发展，相关内容也将适时进行调整。

一、适用范围

本指导原则适用于脊髓性肌萎缩症（(spinal muscular atrophy，SMA)致病基因运动神经元存活基因1（*SMN1*）第7或第7、第8外显子拷贝数变异检测相关试剂的注册。预期用途限定为用于SMA的辅助诊断（遗传诊断）或携带者检测。本指导原则是基于qPCR建立，对于其他检测技术（如MLPA、数字PCR、熔解曲线法、测序法及质谱法等），可能部分要求不完全适用或本指导原则所述技术指标不够全面，申请人可以根据产品特性对不适用部分补充其他的评价和验证，但需阐述不适用的理由，并验证替代方法的科学合理性。

SMA及相关基因的背景信息请见附件。

二、注册审查要点

（一）监管信息

1. 产品名称及分类编码

产品名称应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》及相关法规的要求，如运动神经元存活基因1（*SMN1*）检测试剂盒（PCR-荧光探针法）。按照《体外诊断试剂分类规则》，该产品按照第三类体外诊断试剂管理，分类编码为6840。

2. 申请人还需提交产品列表、关联文件、申报前与监管机构的联系情况和沟通记录及符合性声明等文件。

（二）综述资料

综述资料主要包括概述、产品描述、预期用途、申报产品上市历史及其他需说明的内容。其中，需注意以下内容：

1. 产品描述中应详述检测原理、引物探针设计及其与检测位点的对应关系，选择依据以及结果判断等。拷贝数分析建议包括*SMN1*基因第7外显子或第7、8外显子，明确区分*SMN1*和*SMN2*的原理。

2. 与同类和/或前代产品的比较，应着重从方法学、检验原理、检测的基因名称、检测靶点、变异类型以及临床意义等方面详细说明申报产品与目前市场上已获批同类产品之间的主要区别，并明确申报产品优势与患者受益情况。

3. 预期用途需明确适用人群、样本类型、基因名称、检测位点、变异类型及临床用途。需提交SMA的发病原因、临床症状、流行病学特征、该疾病相关诊断及有效治疗方法，明确现有方法临床应用的优缺点。提交SMA基因型分布的背景资料，明确基因名称、基因组位置、基因转录本号。对于拷贝数变异，需明确检测靶点、选择依据及行业认可证据，详述变异信息、致病作用机制、遗传模式、变异后果、变异检出率以及境内外人群数据等, 提交参考的数据库及支持性文献等。申请人需根据产品设计及临床研究合理声称适用人群及预期用途。

综述资料应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》和《关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告》。

（三）非临床资料

1. 产品技术要求及检验报告

1.1 产品技术要求

申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下，根据产品研制、前期评价等结果，依据国家标准、行业标准及有关文献资料，结合产品特性按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》[（2022年第8号）](https://www.cmde.org.cn/directory/web/WS01/images/0r3Bxsb30LWy+sa3vLzK9dKqxOx4NC01ri1vNSt1PKjqDIwMjLE6rXaOLrFo6kuZG9j.doc)的要求编写指导原则。该类产品作为三类体外诊断试剂，应将主要原材料及生产工艺要求等内容作为附录附于技术要求正文后。

如有适用的国家标准、行业标准，产品技术要求的相关要求应不低于相应的要求。

1.2 产品检验报告

根据《体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告》的要求，申请人应当提供三个不同生产批次产品的检验报告，有适用的国家标准品的，应当使用国家标准品对产品进行检验。报告形式可为申请人出具的自检报告或委托有资质的医疗器械检验机构出具的检验报告。申请人开展自检的，应当符合《医疗器械注册自检管理规定》及相关法规的要求。

2. 分析性能研究

申请人应根据产品特性提交详细的分析性能评估资料，包括试验地点、适用仪器、试剂规格、批号、试验方法、试验样本（需明确类型、来源、数量、处理方法、*SMN1*与*SMN2*拷贝数及其确定方法等）、可接受标准、统计方法、试验数据及结论等，并需对*SMN1*和*SMN2*之间的相互影响进行充分评估。分析性能评估的试验方法可以参考国内外有关体外诊断产品性能评估的指导原则。

如试剂用于不同适用机型，需要在不同机型上分别进行性能评估。

每项性能评估应尽量采用与适用样本类型一致的临床样本，并应涵盖正常人、携带者（如适用）及患者的不同样本。

2.1样本稳定性

样本稳定性一般包括样本各种实际运输及储存（常温、冷藏和冷冻）条件下的保存期限验证，以确认样本的保存条件及保存时间。可以在合理的温度范围内，每间隔一定的时间段即对储存样本进行验证，从而确认不同类型样本的稳定性。可冷冻保存的样本还应对冻融次数进行合理验证。

如核酸提取液可保存，还需对核酸提取液的保存条件和保存时间进行研究。

2.2 适用的样本类型

如果试剂适用于多种样本类型，应采用合理方法对每种样本类型及添加剂（如抗凝剂）进行适用性的研究确认。对于不同的样本类型应分别提交相应的分析性能评估资料。

2.3核酸提取/纯化性能

在进行靶核酸检测前，应有适当的核酸提取/纯化步骤。该步骤应最大量分离和纯化目的核酸并尽可能去除PCR抑制物。无论检测试剂是否含有核酸提取/纯化组分，申请人都应对配套使用的核酸提取/纯化方法的提取效率和提取核酸纯度、浓度、检测限、精密度等进行充分的验证，并评价该方法能否满足该类产品的要求。不同样本类型应分别进行核酸提取/纯化性能的研究验证，并明确提取核酸的质量评价标准。

2.4 检测准确性

建议采用若干份临床样本验证该类产品的检测准确性，样本类型与说明书声称的样本类型一致，样本应涵盖所有可检测的基因拷贝数，建议对低、中、高不同DNA浓度的样本进行研究。提供所有试验用样本来源、型别及拷贝数确认等试验资料。

2.5精密度

*SMN1*精密度评价应至少包含0拷贝、1拷贝及2拷贝*SMN1*基因的不同临床样本，试验操作完全按照说明书执行，包含核酸提取/纯化等步骤。应对每一反应体系进行精密度评价。

精密度评价需满足如下要求：

2.5.1对可能影响检测精密度的主要因素进行验证，除检测试剂本身外，还包括分析仪器、操作者、地点、时间、检测轮次和试剂批次等。

2.5.2设定合理的精密度评价周期，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试验以对室间重复性进行评价。

2.5.3用于精密度评价的临床样本至少设置低浓度和中/高浓度水平。

2.5.4精密度指标可设置为CV等（如有），申请人应对精密度指标评价标准做出合理要求。

2.6 检测限

*SMN1* 拷贝数检测的检测限包括最高和最低检测限。

最低检测限可定义为在满足一定的检测准确性和精密度的条件下，能够检出目标基因不同拷贝数的最低人基因组DNA浓度。

最低检测限的确立：可采用包含不同*SMN1*拷贝数的临床样本进行研究，对于罕见型别可采用人源性细胞系。对人基因组DNA样本梯度稀释，对每个浓度水平重复检测3～5次，可通过以100%可检出的最低浓度作为估计检测限，然后在此浓度附近制备若干浓度梯度样本，每个浓度至少重复20次检测，将具有95%检出率水平浓度作为最低检测限。

最低检测限的验证：应对试剂盒涵盖的所有的检测位点进行检出能力的验证，至少包括含有0、1、2拷贝*SMN1*基因第7外显子或第7、第8外显子的临床样本。

同时，申请人亦应评价产品可准确检出*SMN1*不同拷贝数的人基因组DNA浓度上限，即适当检出率水平下的最高人基因组DNA浓度，建议采用含有高拷贝*SMN2*基因的不同*SMN1*基因型样本进行最高检测限的建立和确认研究。样本要求同最低检测限评价要求。

应提供所有试验用样本来源、型别、样本浓度及*SMN1*及*SMN2*拷贝数确定的方法等试验资料。

2.7分析特异性：

分析特异性受干扰和交叉反应的影响。申请人应对样本中常见的干扰物质和可能引起交叉反应的物质进行研究。

2.7.1交叉反应：

申请人应针对微生物（如适用）、核酸序列相近或具有同源性、以及其他易引起交叉反应的变异类型序列进行交叉反应研究。申请人应说明交叉反应样本的来源、制备方法、基因拷贝数确认方法，提交详细的验证资料。同时申请人还应验证检测靶序列范围内常见突变位点的交叉干扰。

申请人应对*SMN2对SMN1*交叉干扰进行研究。应对不同*SMN1：SMN2*的拷贝数组合进行充分验证。如含有高拷贝*SMN2*（4～5拷贝）的高浓度样本对*SMN1*的不同拷贝数产生的交叉干扰反应（应包括第7外显子或第7、第8外显子）。

申请人应提交交叉反应序列的选择依据，说明交叉反应样本的来源/制备方法、核酸序列确认方法，提交详细的验证资料。

2.7.2应针对可能的内源和外源性干扰物进行干扰试验研究。内源干扰物主要涉及血脂、胆红素、血红蛋白和白蛋白，外源干扰物主要包括适用人群血液样本采集可能用到的抗凝剂、常用药物及其他可能引入的干扰物质等。针对不同样本类型，建议分别进行相应的干扰研究。

干扰试验可通过在临床样本中人工添加干扰物质的方式，评价干扰物质对目标序列检测的影响，也可直接采集暴露于干扰因素后的受试者样本，进行干扰试验评价。建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度（“最差条件”）条件下进行评价；如有干扰，应确定不产生干扰的最高浓度。

2.8对于采用2-ΔΔCt法的试剂，需提交目的基因和内参基因扩增效率一致性研究资料。

3. 稳定性研究资料

申报试剂的稳定性主要包括实时稳定性（有效期）、使用稳定性（如开瓶稳定性、复溶稳定性（如适用）、机载稳定性（如适用）等）、运输稳定性、冻融次数限制（如适用）研究等。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。

实时稳定性研究应采用至少三批样品在实际储存条件下保存至成品有效期后，选取多个时间点进行产品性能评价，从而确定产品保存条件和有效期。

4. 阳性判断值或参考区间研究资料

建议申请人纳入一定数量的临床样本，结合产品特性可采用受试者工作特征（ROC）曲线或其他合理方法对产品用于结果判断的标准/临界值进行研究确认。样本应包括来自正常人、携带者及患者不同拷贝数的各种基因型（如至少应包含0、1、2拷贝数*SMN1*基因的样本），申请人应详细阐述所采用方法的选择依据（如权威文献、行业共识等），并详细阐述计算公式和各参数代表的意义。

应提交详细研究方案，试验数据和统计分析过程。明确所用样本类型、样本来源、样本量估算的方法、样本例数、临床背景信息、基因型及拷贝数确认过程及数据等信息。

如试剂判读存在灰区，应解释说明灰区范围的确定方法。灰区的设定应提交理论和实际试验结果的依据，并在说明书【阳性判断值】和【检验结果的解释】项进行解释说明。

5. 其他资料

5.1主要原材料研究资料

主要原材料研究资料包括主要反应成分、对照品/质控品及企业参考品的研究资料。

5.1.1此类产品的主要反应成分一般包括人基因组核酸提取/纯化试剂、检测所需引物、探针、酶、dNTPs等。申请人应提交相关原材料的来源、选择、制备方法的研究资料，质量分析证书，质量标准的制定和检验资料。如为申请人自制，应提交详细的工艺稳定性研究资料；如为外购，还应提交供应商筛选资料以及供应商提供的原材料质量检定报告。如适用，提交企业参考品的研究资料，包括来源、组成、阴阳性和/或量值确认等。

5.1.1.1核酸提取/纯化试剂（如有）的主要组成、原理介绍及相关的验证资料。如产品不包含提取试剂，则需明确配套的核酸提取/纯化试剂并提交相应的提取效率验证资料。

5.1.1.2引物、探针

申请人应详述*SMN1*及内控基因（如适用）引物探针的设计原则、靶基因座位选择、靶基因信息（基因名称、参考序列号），同时应提供引物探针核酸序列、模板核酸序列及两者对应关系。建议设计多套引物探针以供筛选，针对待测位点的准确性、特异性等进行评价，选择最佳设计，并提交详细的筛选研究数据。

申请人应针对选定的引物探针原材料进行质量评价，一般包括：序列准确度、纯度（HPLC纯等）、浓度、探针荧光标记基团的激发波长和发射波长（如适用），以及功能性试验等，并依据评价结果建立合理的质量标准。

由于*SMN1*和*SMN2*高度同源，只有5个碱基不同，应从产品设计开发角度详述如何避免*SMN1*和*SMN2*的相互影响。

5.1.1.3酶

酶包括DNA聚合酶和/或尿嘧啶DNA糖基化酶（UDG/UNG）等。申请人应针对各种酶的活性进行验证，提交功能性试验资料，并确定酶的质量标准。如有降低Taq酶非特异性扩增的措施，需详细描述（例如采用热启动酶，Taq抗体等）。

DNA聚合酶应具有DNA聚合酶活性，无核酸内切酶活性，具有5’-3’外切酶活性（如适用），具热稳定性。UDG/UNG应具有水解尿嘧啶糖苷键的活性，无核酸外切酶及核酸内切酶活性。

5.1.1.4脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）

包括dATP、dCTP、dGTP、dTTP或dUTP；应提交对其纯度、浓度等的验证资料，以及功能性试验资料，并确定质量标准。

5.1.2对照品/质控品

试剂盒应根据检测原理设置各种对照品（质控品）、质控探针（如适用）来实现对产品整个反应体系的有效监控。通常至少包括含有0拷贝、1拷贝及2拷贝*SMN1*第7外显子或第7、8外显子的对照品和空白对照。空白对照为不含靶核酸的溶液。

申请人应对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制，明确所采取的具体措施（如设置内标等）、选择依据，并提交相应研究资料。

对照品可采用人基因组DNA、细胞系提取的基因组DNA或质粒等。对照品应参与样本核酸的平行提取。申请人应提供对照品原料选择、制备、基因序列确认、拷贝数及浓度确定过程、内参基因与靶基因的比例确定等的详细研究数据，并对其检测结果做出明确的范围要求。

产品如涉及用于拷贝数计算的内控基因及对照品, 需提供内控基因的选择依据、内控基因与靶标之间的相互影响、对照品的选择依据、原料来源、制备过程、基因拷贝数确认及DNA浓度确定等的详细研究资料，并提交质量标准建立资料，建议采用临床样本或细胞系或其提取的基因组DNA。

5.1.3企业参考品

*SMN1*拷贝数变异检测试剂的企业参考品主要包括*SMN1*纯合缺失参考品、*SMN1*单拷贝参考品、*SMN1*多拷贝参考品、特异性参考品、检测限参考品和精密度参考品等，可根据预期用途的不同，将相应拷贝数参考品设置为阳性参考品或阴性参考品。设置参考品时应充分考虑*SMN1*和*SMN2*之间的相互影响，并至少明确*SMN1*和*SMN2*（如适用）拷贝数。申请人应提交企业参考品的具体组成、原料来源、选择、制备方法、基因拷贝数确认、DNA浓度确认以及检验标准的详细研究资料等。建议采用临床样本、临床样本提取的基因组DNA或细胞系制备，样本应明确其来源及型别确认资料。若采用细胞系，如为自制，需提交详细的细胞系构建资料及确认资料；如为外购，应提供外购商名称、细胞系名称、细胞类型、基因型信息及确认资料，并提供外购商提供的质检报告。

5.1.3.1 *SMN1*纯合缺失参考品：应至少包括0拷贝*SMN1*第7外显子以及0拷贝*SMN1*第8外显子（如包含第8外显子检测）的纯合缺失型样本。

5.1.3.2 *SMN1*单拷贝参考品：主要包括含1拷贝*SMN1*第7外显子的杂合缺失型样本，或含1拷贝第7、第8外显子（如适用）的杂合缺失型样本。

5.1.3.3 *SMN1*多拷贝参考品：应包括含2拷贝及大于2拷贝（如适用）的*SMN1*第7外显子或第7、第8外显子样本。

5.1.3.4特异性参考品：建议包括高浓度*SMN2*不同拷贝数样本及易产生交叉反应的同源序列样本。同时应尽量包含检测范围外其他检测位点的样本等。其中*SMN2*不同拷贝数样本应包括不同的*SMN1：SMN2*拷贝数比例，*SMN1*拷贝数应包括产品可检测的拷贝数范围，至少包括0拷贝、1拷贝、2拷贝，*SMN2*基因至少包括4-5拷贝。如涉及纳入检测范围外其他罕见型别，也可采用质粒。

5.1.3.5 检测限参考品：浓度水平可选择最低检测限附近水平，应至少包含可检测的*SMN1*第7外显子或第7、第8外显子拷贝数范围，至少包括0*、*1、2拷贝。

5.1.3.6精密度参考品应至少包括*SMN1*拷贝数为单拷贝（[1+0]）和多拷贝(大于等于2拷贝）的低浓度临床样本、临床样本提取的人基因组DNA或细胞系。

如有适用于*SMN1*或*SMN2*拷贝数检测的国家标准品，企业参考品的要求应不低于国家标准品。

5.2 主要生产工艺及反应体系的研究资料

主要生产工艺研究资料包括工作液配制（引物、探针浓度、酶浓度、dNTPs浓度、缓冲液离子浓度等）、分装和冻干（如有）、荧光标记（如有）等工艺过程的描述及确定依据。生产过程应对关键参数进行有效控制，可采用流程图方式描述生产工艺，标明关键工艺质控步骤，并详细说明该步骤的质控方法及质控标准。

反应体系研究指反应条件的选择确定过程，包括分析前样本类型的选择、样本采集、预处理（如有）、样本用量、试剂用量、PCR反应体系及检测过程中的反应条件/参数、阈值循环数（Ct值）等的确定，并需明确样本所需达到的质量标准及确定过程。如产品包含核酸分离/纯化试剂，应提交对核酸分离/纯化过程进行的研究资料。

不同适用机型的反应条件如有差异应分别提交。

（四）临床评价资料

该类试剂应通过临床试验路径进行临床评价。临床试验应满足《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的要求，如相关法规、文件有更新，临床试验应符合更新后的要求。下面仅说明该类产品临床试验中应关注的重点问题。

1.针对“脊髓性肌萎缩症辅助诊断”预期用途

基于目前的产品申报现状，该预期用途用于检测*SMN1*基因的拷贝数变异，应至少包括第7外显子的拷贝数变异，但不包括该基因点突变等其他变异。

1.1临床试验机构及人员

申办者应根据产品特点及预期用途，综合不同地区人种和流行病学背景等因素，选择不少于3家（含3家）符合法规要求的临床试验机构开展临床试验。

1.2临床试验适用人群和临床样本

该预期用途的适用人群一般包括：具有相关症状和/或体征的疑似脊髓性肌萎缩症患者；需与脊髓性肌萎缩症进行鉴别诊断的其他疾病患者（如：先天性肌病、先天性及各类肌营养不良、代谢性肌病、重症肌无力、先天性肌无力综合征、周围神经病或Prader-willi综合征等）。

临床样本一般为抗凝外周全血样本。临床样本的采集、处理、保存和提取等应分别满足申报产品说明书、对比方法/对比试剂说明书及第三方试剂说明书（如有）的相关要求。

1.3临床试验对比方法

如已有同类产品上市，原则上应选择已上市同类产品作为对比试剂，对比试剂应涵盖申报产品的检测范围。

1.4最低样本量和阳性例数

应采用适当的统计学方法估算样本量，详细描述所使用统计方法及各参数的确定依据。

针对试验体外诊断试剂检测性能的验证，建议采用单组目标值法分别估算每个外显子的最低样本量，通过阳性符合率或阴性符合率分别估算阳性和阴性样本的例数，同时考虑脱落情况，估算最低样本总量。阳性符合率和阴性符合率的目标值（临床可接受的最低标准）均不低于95%。其中，阳性样本包括拷贝数为1（杂合型）和0（纯合缺失型）的样本，阴性样本包括拷贝数为2（野生纯合型）的样本。综合考虑统计学要求、临床流行率及申报产品的技术特点，建议每个外显子的0拷贝（纯合缺失型）样本应不少于100例。

2.针对“携带者检测”预期用途

基于目前的产品申报现状，该预期用途用于*SMN1*基因的拷贝数变异，应至少包括第7外显子的拷贝数变异，但不包括该基因其他点突变等微小变异，且不包括*SMN2*基因。该预期用途的应用应符合国家及地方卫生管理部门的相关规定。

2.1临床试验机构和人员

申办者应根据产品特点及预期用途，综合不同地区人种和流行病学背景等因素，选择不少于3家（含3家）符合法规要求的临床试验机构开展临床试验。

建议选择不同地区的临床试验机构开展临床试验，且临床试验机构应具有相关检测的优势。临床试验操作人员应经过相应的培训，并能熟练操作试验。机构和人员应遵循《医疗机构临床实验室管理办法》及其他相关规定。试验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。

2.2临床试验适用人群和临床样本

该预期用途的适用人群为孕前或孕早期人群。

临床样本一般为抗凝外周血样本。临床样本的采集、处理、保存和提取等应符合国家卫生健康委员会等相关文件的规定，并满足相关产品说明书的要求。

2.3最低样本量和阳性例数

应根据临床评价标准选择合适的统计学模型，同时结合适用人群的携带率进行样本量估算，并在临床试验方案中明确最低样本量确定的依据。建议采用单组目标值法分别估算每个外显子的最低样本量，通过阳性符合率估算阳性样本的例数，同时结合携带率，并考虑脱落情况，估算最低样本总量。估算样本量时，阳性符合率的目标值（临床可接受的最低标准）不低于95%。

为评估试验体外诊断试剂的临床意义和临床价值，临床试验应进行前瞻性研究，并通过前瞻性研究检出一定数量的夫妻双方均为携带者的病例。

进行结果的统计分析时，阴性符合率的点估计值应不低于97%。

2.4临床试验方法

建议采用临床公认的方法（如：MLPA方法等）或已上市同类产品作为对比方法/对比试剂，评价试验体外诊断试剂的临床性能。如选择临床公认的方法作为对比方法，应对该方法进行严格的性能确认，并应严格按照建立的方法及相关规定等进行临床试验及质量控制。

3.如有其他预期用途，应设计科学的临床试验，提供充分的证据，证明其预期用途。

4.不同预期用途的通用要求

4.1临床试验方法、数据及统计分析

4.1.1应在临床试验方案、小结和报告中明确试验体外诊断试剂、对比方法/对比试剂和第三方试剂（如有）的试验方法。

4.1.2 临床试验数据表应以列表方式表示，包括试验体外诊断试剂的结果、对比方法/对比试剂的结果、第三方试剂的检测结果（如有）、临床诊断背景信息、年龄和性别等。其中，临床诊断背景信息为脊髓性肌萎缩症的病例应明确其实验室诊断依据，如：复合杂合突变的检测结果等。

4.1.3以交叉表分别总结两种方法/试剂的定性检测结果，选择合适的统计方法进行统计分析，以验证两种方法/试剂检测结果的一致性。同时，统计试验体外诊断试剂与临床诊断进行比对时的临床灵敏度和临床特异度。

4.1.4 结果差异样本的验证

在数据收集过程中，对于两种方法/试剂检测结果不一致的样本，应采用合理方法进行复核，并结合临床诊断和实验室检测结果等对差异原因进行充分分析。

4.2临床试验方案

各临床试验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，不可随意改动。整个试验过程应在临床试验机构的实验室内并由该实验室的技术人员操作完成，申办者的技术人员除进行必要的技术指导外，不得随意干涉试验进程。

试验方案应确定严格的入选/排除标准，任何已入选的样本被排除出临床试验都应记录在案并明确说明原因。在试验操作过程和结果判定时，应采用盲法以保证试验结果的客观性。各临床试验机构选用的对比方法/对比试剂应保持一致，以便进行合理的统计学分析。另外，试验体外诊断试剂的样本类型不应超越对比方法/对比试剂对样本类型的要求。

4.3临床试验小结和报告

应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，并应包括必要的数据和统计分析方法。

（五）产品说明书

产品说明书是体外诊断试剂注册申报最重要的文件之一。产品说明书格式应满足《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求（按照现行版本执行）。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，并单独列明参考文献的相关信息。

下面对*SMN1*基因拷贝数检测类产品说明书的重点内容进行阐述。

1.【预期用途】应至少包括以下几部分内容：

1.1本产品用于检测人xx样本基因组DNA中的*SMN1*xxx位点的拷贝数变异，用于xxxx用途。其中xx需明确适用的样本类型，xxx需明确检测的位点，xxxx根据支持的临床证据可包括SMA的辅助诊断（遗传诊断）和携带者检测。

1.2介绍SMA相关的临床背景信息及实验室诊断方法等，介绍被测靶标的相关情况。

2. 【检验原理】

2.1对试剂盒的被测靶标进行详细描述（基因组位置、基因的转录本号，外显子7及8的相关特征等），对试剂盒所用探针、引物或拷贝数的判定等进行详细介绍；对不同样本反应管组合、内参基因设置、对照品（质控品）设置及荧光信号检测原理等进行介绍。

2.2试剂盒技术原理的详细介绍，建议结合适当图示进行说明。如反应体系中添加了相关的防污染组分（如UNG酶），也应对其作用机理进行适当介绍。对区分*SMN2*的原理进行详细描述。如需通过计算对*SMN1*的拷贝数进行判断，应详述计算原理及公式。

1. 【主要组成成分】

3.1说明试剂盒包含组分的名称或数量等信息，说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。

3.2试剂盒中不包含但对该项检测必需的组分，企业应列出相关试剂/耗材的名称及其他相关信息。

3.3如果试剂盒中不包含用于核酸提取纯化的试剂组分，则应在此注明经过验证后配合使用的商品化核酸提取纯化试剂盒的生产企业、产品名称和医疗器械备案号（如有）等详细信息。

4.【储存条件及有效期】

说明试剂盒的效期稳定性等，应明确具体的储存条件及有效期等信息。

5.【适用仪器】

明确经验证的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】

详述样本类型的选择与样本处理的要求。样本的采集、处理、运送和保存：明确样本采集、核酸提取纯化前的处理（如离心和洗涤等）、保存条件及期限以及运送条件等。冷藏/冷冻样本检测前是否需要恢复至室温，冻融次数的限制等。

7.【检验方法】

详细说明试验操作的各个步骤，包括：

7.1试验条件：实验室分区、试验环境的温度、湿度和空调气流方向控制等注意事项。

7.2试剂配制方法和注意事项。

7.3详述核酸提取纯化的条件、步骤及注意事项（如适用），对核酸提取纯化环节进行合理质控，明确提取核酸的浓度纯度等质量要求。

7.4扩增反应前准备：加样体积、顺序等。

7.5 PCR各阶段的温度、时间设置、循环数设置或相应的自动化检测程序及相关注意事项。

7.6 熔解曲线（如适用）: 各阶段温度、时间设置，升温速度。

7.7 仪器设置（如适用）：特殊参数、探针的荧光素标记情况、对待测样本及其他对照品的荧光通道选择等。

8.【参考区间或阳性判断值】

简要概述参考区间或阳性判断值具体判断标准及研究验证情况。需对不同*SMN1*拷贝数的参考区间或阳性判断值分别进行描述。

9.【检验结果的解释】

结合对照品、样本管、参比样本检测结果以及检测类型，以列表形式详述所有可能出现的结果及相应的解释。如存在检测灰区，应详述对于灰区结果的处理方式。

需明确不同的结果应进一步采取何种措施，何种情况需进行遗传咨询。

仅为生殖腺嵌合体的携带者，采用血液细胞检测可能为阴性结果。

10.【检验方法的局限性】

10.1对产品可检出及不能检出的变异类型进行说明。

10.2 产品仅对下述检测类型xx进行了验证。

10.3有关假阴性及假阳性结果的可能性分析。

10.3.1不合理的样本采集、运送及处理或核酸过度降解均有可能导致假阴性结果。

10.3.2未经验证的其他干扰或PCR抑制因子等可能会导致假阴性结果（如有）。

10.3.3高拷贝*SMN2*与*SMN1*之间相互的影响。

10.3.4 *SMN1*微小突变无法检出可能导致的假阴性。

10.3.5 由于引物探针结合位置发生的多态性或点突变而可能导致的假阳性。

10.3.6 其他可能引起假阳性或假阴性的情形。

10.4对[2+0]基因型、微小突变及*SMN1*缺失的低比例嵌合体、检测范围外的其他外显子拷贝数变异、*SMN1-SMN2*融合基因等检出能力的局限性进行说明（如不能检出）。

10.5有症状患者的杂合缺失需要进一步采取合适的方法确认。

10.6本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据，为达到诊断目的，此检测结果要与临床检查、病史、连锁遗传分析及其他的检查结果综合使用。

11.【产品性能指标】简述以下性能指标：

11.1对相应国家标准品（如有）检测的符合情况。

11.2 准确性：简述研究用样本、试验方法和评价结果。

11.3 最低检测限：简单介绍最低检测限的确定方法，并明确最低检测限结果。

11.4精密度：简单介绍精密度的确定方法，并明确精密度结果。

11.5 检测范围：明确可准确、特异检测*SMN1*基因拷贝数变异的人基因组DNA浓度范围。

11.6分析特异性：

11.6.1交叉反应验证：交叉反应验证情况（包括*SMN2*基因及其他易产生交叉反应序列的交叉反应等）。

11.6.2干扰物质验证：样本中常见干扰物质对检测结果的影响。

11.7 临床试验：简要介绍临床试验样本、试验方法、所采用的统计学方法及统计分析结果。

12.【注意事项】应至少包括以下内容：

12.1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。

12.2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》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。

12.3携带者检测前后应进行遗传咨询，强调残余风险。无论其外周血基因检测结果是否提示为携带者，再次生育时均应进行产前诊断。

三、参考文献

[1] 体外诊断试剂注册与备案管理办法[Z].

[2] 关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告 [Z].

[3] 体外诊断试剂临床试验技术指导原则 [Z].

[4] 体外诊断试剂说明书编写指导原则 [Z].

[5] 北京医学会医学遗传学分会, 北京罕见病诊疗与保障学会. 脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识[J]. 中华医学杂志, 2000, 100(40):3130-3140.

[6] 北京医学会罕见病分会, 北京医学会医学遗传学分会, 北京医学会神经病学分会神经肌肉病学组, 中华医学会儿科学分会神经血族, 中华医学会神经病学分会神经遗传学组, 中华医学会儿科学分会康复学组. 脊髓性肌萎缩症多学科管理专家共识[J], 中华医学杂志, 2019, 99(19):1460-1467.

[7] 中华医学会医学遗传学分会遗传病临床实践指南撰写组.脊髓性肌萎缩症的临床实践指南[J]. 中华医学遗传学杂志, 2020,37(3):263-268.

[8] 赵玉沛名誉主编, 张抒扬主编. 罕见病诊疗指南(2019年版)[M]. 北京：人民卫生出版社，2019.

[9] 国家卫生健康委员会、科学技术部、工业和信息化部、国家药品监督管理局、国家中医药管理局. 第一批罕见病目录[Z]. 2019.

附件：背景信息

附件

背景信息

脊髓性肌萎缩症(spinal muscular atrophy，SMA)是一组以脊髓前角ɑ-运动神经元退化变性导致的肌无力和肌萎缩为主要临床特征的遗传性神经肌肉病，是儿童最常见的神经肌肉病。SMA最常见的形式是由定位于5q13.2的运动神经元存活基因1（motor neuron survival gene1，*SMN1*，OMIM # 600354）致病性变异所导致的5q-SMA，约占所有SMA病例的95%，呈常染色体隐性遗传。SMA患者临床表现差异大，从出生前到成人期均可发病，发病率约为1/10000-1/6000，携带率为1/50-1/40，具有种族差异性。SMA已被列入国家卫生健康委员会、科学技术部、工业和信息化部、国家药品监督管理局、国家中医药管理局联合公布的《第一批罕见病目录》中。

人基因组有两个高度同源的*SMN*基因（同源性>99.9%），位于5q13.2端粒侧的*SMN1*（NG\_008691.1）基因和着丝粒侧的*SMN2*，两者仅存在5个碱基差异，其中位于第7外显子第6位c.840的C/T（*SMN1*为c.840 C，*SMN2*为c.840 T）导致90%的*SMN2* mRNA第7外显子被选择性剪接，仅有10%的*SMN2*表达全长有功能的SMN蛋白。*SMN1*决定疾病的发生，而*SMN2*影响疾病的严重程度和进展。

*SMN1*基因编码的全长SMN蛋白在各组织细胞广泛表达，*SMN1*基因的致病性突变可引起SMN蛋白表达水平下降或功能丧失。在表型正常（包括正常人和携带者）的人群中，*SMN1*基因拷贝数常为1~4个，正常人基因型包括常见的[1+1]型及罕见的[2+1]型和[2+2]型；携带者其中一条染色体含1或2拷贝功能正常的*SMN1*基因，另一条染色体含缺失或微小变异的功能异常*SMN1*基因，基因型可为杂合缺失 （[1+0]型、[2+0]型）或杂合突变（[1+1d]和[2+1d]型） （d代表*SMN1*基因内含有微小变异而功能异常，如无义突变、移码突变、错义突变等）。

在表型异常的SMA患者中，突变基因型主要有两类，95%由*SMN1*双等位基因纯合缺失（[0+0]基因型）所致；5%由*SMN1*复合杂合突变（[0+1d]基因型）所致，*SMN1*双等位基因均为微小变异（[1d+1d]）的情况则非常罕见。*SMN1*缺失大部分为外显子7合并外显子8共同缺失，少部分仅为外显子7缺失。

*SMN2*全长mRNA编码与*SMN1*相同的SMN蛋白。*SMN2*的拷贝数从0到多个不等。*SMN2*拷贝数是目前公认的SMA修饰因子，患者携带*SMN2*拷贝数越多表型越轻*，*但其与表型的相关性不完全一致，*SMN2*的序列变异及其他基因也可能影响SMA的表型。因此，*SMN2*的拷贝数结果只能对SMA患病儿童或胎儿的临床严重程度提供一种可能性的参考信息而非确定性结论。此外对非患者人群不需要进行*SMN2*的拷贝数检测。

临床疑诊为SMA的患者，可选择基因检测、血清肌酸激酶（CK）、肌电图检查、肌肉病理进行辅助检查以明确诊断。其中*SMN1*拷贝数和致病性变异的检测结果用于疾病诊断或排除诊断，若*SMN1*基因第7外显子或第7、8外显子纯合缺失，即可诊断为*SMN1*纯合缺失型患者。对于非纯合缺失变异，还需对*SMN1*的致病性微小变异进行分析确认。

SMA携带者检测的靶标至少包括*SMN1*第7外显子，当*SMN1*第7外显子为1个拷贝数时，即为SMA携带者。*SMN2*不在携带者检测范围。

综上所述，考虑到目前国内注册申报的产品均为*SMN1*检测试剂，本指导原则仅对*SMN1*基因检测试剂的申报要求进行阐述。基于目前对于*SMN1*检测试剂的认知，本指导原则阐述的*SMN1*检测的预期用途限定为：用于体外检测人外周血样本人基因组DNA中运动神经元存活基因1（*SMN1*）第7或第7、第8外显子拷贝数变异，用于SMA的辅助诊断（遗传诊断）或携带者检测。如申报其他预期用途，申请人可根据产品具体特性进行评价，适用部分可参考本指导原则。

常用的*SMN1*基因拷贝数检测方法包括多重连接探针扩增（MLPA），定量聚合酶链反应法（qPCR）等。MLPA与qPCR方法均不能检测*SMN1*微小变异及[2+0]基因型。本指导原则是基于qPCR建立，对于其他检测技术（如MLPA、数字PCR、熔解曲线法、测序法及质谱法等），可能部分要求不完全适用或本文所述技术指标不够全面，申请人可以根据产品特性对不适用部分补充其他的评价和验证，但需阐述不适用的理由，并验证替代方法的科学合理性。