肿瘤个体化治疗相关基因突变检测试剂注册审查指导原则（2022年修订版征求意见稿）

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。

口语话的语言修改。

一、适用范围

本指导原则适用于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。本指导原则仅适用于具有伴随诊断用途的基因突变检测试剂。

本指导原则所指基因突变的类型包括置换、插入、缺失、融合基因、拷贝数异常及核糖核酸（RNA）表达异常等广义的基因突变，不包含肿瘤突变负荷、微卫星不稳定性。

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、数字PCR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指导原则所述技术指标不够全面，申请人可以根据实际产品特性选择适合的方法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。本指导原则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基因突变检测的其他方法学。

本指导原则适用于进行注册申报和变更注册的产品。本指导原则针对注册申报资料中的部分内容进行撰写，其他未尽事宜应当符合《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》等法规要求及其他伴随诊断相关指导原则要求。

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。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。其中同类产品上市情况介绍部分应着重从方法学、不同基因突变类型检出能力及伴随诊断药物、适用人群及临床意义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肿瘤治疗药物的相关性，说明科学依据。

提交的资料应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（以下简称《办法》）和《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》的相关要求。

（三）非临床资料

1.产品技术要求及检验报告

按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》的要求编写产品技术要求，并提交三个不同批次符合产品技术要求的全项目检验报告。提交资料应符合《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》《医疗器械自检管理规定》等相关文件的要求。

2.分析性能研究

注册申请人应当在原材料和生产工艺经过选择和确认、质量管理体系得到有效控制并且保证产品质量稳定的基础上，采用完整、确定的检测系统进行分析性能评估。

对于每项分析性能的评价都应包括具体研究目的、研究方法、试验方案、试验数据、统计分析等详细资料。有关分析性能验证的背景信息也应在申报资料中有所体现，包括实验地点、采用的试剂名称、规格和批号，仪器名称和型号，样本类型和来源等。分析性能评估的试验方法可以参考国际或国内有关体外诊断试剂性能评估的指导原则进行。若试剂用于RNA样本检测，则在性能评估中（除非特别说明）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。

建议着重对以下分析性能进行研究。

2.1样本稳定性

样本稳定性研究主要包括核酸分离/纯化前样本稳定性和分离/纯化后核酸在储备液中的稳定性两方面。在包含最不利情形的储存条件下储存,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。如果包括多种样本类型，则需分别完成相关研究。

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准确度

申请人可采用以下两种方法之一对基因突变型的检出能力进行准确度研究。一种方法是方法学比对，采用申报试剂与标准方法（或参考方法）或同类已上市产品，同时检测同一批临床样本，比较检测结果之间的一致性程度；另一种方法是与标准物质进行比较，使用待评估的项目对已知标准的标准物质进行分析，将检测结果与已知标准值进行比较。

2.4企业参考品检验

根据主要原材料研究资料中的企业参考品设置情况，采用至少三批产品对企业参考品进行检验并提供详细的试验数据。

2.5精密度

精密度评价应采用临床样本进行试验，试验操作完全按照说明书执行，包含核酸提取/纯化等样本处理步骤。注册申请人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。

2.5.1对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，应考虑运行、时间、操作者、仪器、试剂批次和地点等影响精密度的条件，设计合理的精密度试验方案进行评价。精密度评价试验应包含核酸提取/纯化步骤。

2.5.2设定合理的精密度评价周期，例如：为期至少20天的检测，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试验以对室间精密度进行评价。

2.5.3用于精密度评价的样本应考虑伴随诊断相关基因的常见突变位点及所有突变类型的临床样本，并应包含每一反应单元易错或代表性的样本。应阐述研究位点选择依据，明确样本的来源、浓度和性质确定方法。设置至少弱阳性和中/高浓度两个水平，并分别至少设置高低两种突变率。建议同时对背景值较高的阴性样本进行验证。如果待测物靶核酸为RNA，则弱阳性样本中应至少包含典型突变位。如果试剂盒可以覆盖多个突变位点的检测，申请人可以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，弱阳性样本需包括所有的突变位点。

2.6检出限

应包括对所有突变位点的检出限确定和验证研究资料。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。

2.6.1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/40μL水平，可以达到95%阳性检出率的最低突变序列百分率为10%。

2.6.2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。

采用合理的试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，40μL扩增反应终体系中，DNA浓度的最低检测限为50ng/40μL。

2.6.3 同时，申请人亦应评价申报产品可准确检出的人基因组DNA浓度上限，即适当检出率水平下的最高人基因组DNA浓度。

2.6.4建议评价肿瘤细胞比例对最低检测限可能造成的影响。例如，对于病理组织学样本类型，如福尔马林固定石蜡包埋组织（FFPE），应对肿瘤细胞比例进行研究，确定满足性能指标要求的最少肿瘤细胞比例。

2.6.5 应对试剂盒所覆盖的可检测位点进行检测限的研究。

2.7 分析特异性

2.7.1野生型验证：采用高浓度的野生型核酸样本进行验证，结果应为阴性。

2.7.2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：

2.7.2.1申报试剂所覆盖的全部突变类型间的交叉反应；

2.7.2.2核酸序列相近或具有同源性、易引起交叉反应的野生型或其他突变类型序列间的交叉反应。

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来源、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在产品说明书的【产品性能指标】项中有所体现。

2.7.3干扰物质

应针对可能的内源和外源性干扰物进行干扰试验研究。

2.7.3.1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。如对于全血样本，内源干扰物主要涉及血脂、胆红素、血红蛋白和白蛋白等，外源干扰物主要包括血液样本采集可能用到的抗凝剂、样本采集管及保存管中活性成分、常用药物等。病理组织处理过程及样本穿刺过程的缓冲液、处理液、常用治疗药物；非人源的核酸物质等。

2.7.3.2用于干扰试验的样本，靶基因浓度建议采用低突变率条件下包含低浓度在内的至少两个浓度水平，使用医学相关水平的干扰物质进行验证。此外，建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度(“最差条件”)条件下进行评价应结合产品的特点及临床用途，设置合理的结果接受标准，如有干扰，应确定不产生干扰的最高浓度。

2.8样本核酸分离/纯化

样本核酸的分离/纯化主要有以下目的：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，样本核酸分离/纯化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，同时会引入C>T，G>A的假阳性突变，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，增加了核酸分离/纯化的难度。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，以及降低福尔马林固定过程引入的假阳。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，无论申报产品是否含有核酸分离/纯化的组分，企业都应提交配套使用的核酸分离/纯化方法的核酸提取性能研究资料，应对核酸提取效率、提取核酸纯度、浓度、片段完整性以及提取重复性等进行充分的验证，并评价选定的每种核酸提取纯化方法能否满足申报产品的要求，至少应包含对检出限、精密度和干扰性的验证。不同样本类型应分别进行核酸提取/纯化性能的研究验证资料。

2.9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【适用仪器】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。

如申报产品适用不同的核酸提取方法，每种核酸提取方法应配套检测试剂进行各突变基因类型最低检测限验证。

2.10反应体系

2.10.1基因位点选择、方法学特性介绍。

2.10.2确定最佳反应体系的研究资料，包括核酸提取用样本体积、洗脱体积、反应体系中的加样量、试剂用量、反应体系各成分终浓度(如酶浓度、引物/探针浓度、dNTP浓度、阳离子浓度等)

2.10.3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、荧光采集时间的研究资料。

2.10.4提供不同机型基线、阈值、阈值循环数（Ct）、荧光强度（如适用）确定的研究资料。

2.10.5提供质控体系设置、Ct值或靶值确定的研究资料。

2.10.6不同适用机型的反应条件如果有差异应分别详述。

2.10.7如申报产品包含核酸分离/纯化试剂，应提交对核酸分离/纯化过程进行工艺优化的研究资料。

3.稳定性研究资料

主要包括效期稳定性（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。对于效期稳定性研究，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。

4.阳性判断值研究资料

对于此类试剂，阳性判断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）曲线或其他合理的方式对申报产品用于结果判断的临界值予以确认。如果试剂存在灰区，应解释说明灰区范围的确定方法。应针对不同样本类型（如有）分别进行阳性判断值研究，明确是否有差异。申请人应详述试验方案、样本来源、样本量、样本入组标准及试验结果等。

5.其他资料

5.1主要原材料研究资料

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、阴阳性质控品（如包含）、检测所需引物、探针、各种酶、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等相关研究资料。主要原材料如为申请人自制，其生产工艺必须相对稳定，并应提交自制所需原料及自制过程及工艺稳定性验证报告；如为申请人外购，还应提交供应商筛选资料、供应商提供的质量标准、出厂检定报告，以及申请人出具的该原材料到货后的质量检验资料。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。

5.1.2脱氧三磷酸核苷（dNTPs）

主要包括：dATP、dUTP、dGTP、dCTP和dTTP；如为外购，应提交对纯度、浓度、等的质量标准及验证资料。如为自制，需提交自制所需原材料、自制过程、脱氧三磷酸核苷产物鉴定、质量标准（如分子量、浓度、纯度等）制定与验证及功能性验证的资料。

5.1.3引物、探针

申请人应详述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。结合基因突变位点检测原理，明确各引物探针在检测过程中所起的作用。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、分子量、纯度（探针纯度应达到HPLC纯）、浓度、探针荧光标记物及其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。

如为外购，还应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如合成引物探针序列、分子量、序列修饰基团、PAGE结果或高效液相色谱法（HPLC）分析图谱等。应对探针的分子量、纯度及标记的荧光素进行核实，并进行功能性试验验证。

5.1.4酶

DNA聚合酶，应具有DNA聚合酶活性，无核酸内切酶活性，部分酶具有核酸外切酶活性，具热稳定性，如：94℃保温1小时后仍保持50%活性；尿嘧啶DNA糖基化酶（UDG/UNG），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；逆转录酶，具逆转录酶活性，无核酸内切酶活性。应对酶活性进行合理验证。

5.1.5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分离/纯化、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制。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。

5.1.5.1阳性对照品（质控品）

建议对每个样品反应管设置至少一份若阳性对照品（质控品），参与样本核酸的平行提取，以对样本核酸分离/纯化、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品（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。

5.1.5.2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。

5.1.5.3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。

空白对照：

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，从而影响后续试验结果，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分离/纯化环节的质量控制，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，以对核酸分离/纯化的质量及效率进行评估。

5.1.6企业参考品：

应详细说明有关企业内部参考品的原料选择、制备过程、定值研究、评价指标、统计学分析等试验资料。申请人应对内部参考品的来源、基因序列设置等信息进行精确的试验验证，并提供参考品溯源过程的测量程序或参考方法的相关信息及详细的验证资料。如该类产品有国家标准品，在不低于国家标准品要求前提下，申请人可以结合实际情况设置合理的企业参考品。具体要求如下：

5.1.6.1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，每个突变位点设置不同突变百分率梯度，其中至少应包括高浓度和低浓度阳性参考品。阳性参考品的突变形式及拷贝数/浓度需采用有效方法（如测序方法或数字PCR等）确认，并明确接受标准。如为自建方法，需提交自建方法的性能确认资料。

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或其提取的DNA储备液、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冻干粉或假病毒的形式；如可以对其中部分罕见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。

5.1.6.2阴性参考品

应考虑检测特异性的评价，纳入同源序列交叉反应样本、干扰样本等。可采用经确认无相应靶突变序列的野生型DNA储备液

5.1.6.3检测限参考品

检测限参考品的原料要求参考阳性参考品，需包括所有的突变位点。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。

5.1.6.4精密度参考品

精密度参考品原料要求参考阳性参考品，需至少包括弱阳性、中或强阳性水平的精密度验证，中/强阳性精密度参考品可不必包括所有突变类型，以常见突变类型或理论上较难测得的突变序列为主为主，但弱阳性参考品需包括所有突变位点；如果产品包含多个反应管，每个反应管应选择代表性的突变类型设置精密度参考品。如有必要，建议同时设置阴性参考品精密度验证。可选择代表性位点进行精密度参考品的设置。

5.2生产工艺研究资料

生产工艺的研究资料应能对反应体系涉及到的基本内容，如样本用量、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，生产过程应对关键工序或特殊工序、关键参数（如pH、纯化水的电导率、离子浓度等）进行有效控制。主要包括以下内容：

5.2.1反应原理介绍。

5.2.2介绍主要生产工艺，可用流程图结合文字的方式表述，明确关键工艺，并简要说明主要生产工艺的确定及优化研究资料依据。

体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式》

5.3基于同类治疗药物的肿瘤伴随诊断试剂说明书更新与技术审查指导原则

（四）临床试验

临床试验的开展、方案的制定以及报告的撰写等均应符合相关法规及《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的要求。

针对与抗肿瘤药物同步研发的伴随诊断试剂，申请人可按照《与抗肿瘤药物同步研发的原研伴随诊断试剂临床试验技术指导原则》开展临床试验，针对非原研伴随诊断试剂申请人可按照《抗肿瘤药物的非原研伴随诊断试剂临床试验注册审查指导原则》开展临床试验。

（五）产品说明书和标签样稿

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。产品说明书中相关技术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，下面对肿瘤治疗药物伴随诊断试剂相关基因突变检测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、临床试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：

1.1预期用途：本产品用于体外定性检测人xx（肿瘤名称）xxx（样本类型）样本的xxxx（基因名称）突变基因，可以以列表形式列明具体突变位点。其中yy（具体突变位点或类型）用于yyy（伴随的药物名称）药物的伴随诊断。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。

1.2适用人群：伴随诊断试剂适用人群应与抗肿瘤药物的适用人群相对应，应为临床上需要进行检测以明确是否能够使用某种抗肿瘤药物的人群。

1.3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、治疗反应及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

1.4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。

2.【检验原理】

2.1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。

2.2核酸分离/纯化方法、原理等。

2.3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（如尿嘧啶DNA糖基化酶，即UDG/UNG等），也应对其作用机理作适当介绍。

3.【主要组成成分】

3.1详细说明试剂盒内各组分的名称、数量、内容物、比例或浓度等信息，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。

3.2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。

3.3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（如有）等详细信息。

4.【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。

5.【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。

6.【样本要求】

重点明确以下内容：

6.1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。

6.2样本处理及保存：核酸分离/纯化前样本的预处理、保存条件及期限、运输条件及期限（如适用）等。分离纯化后的核酸如可不立即使用，则需明确其保存条件和保存期限，如冷冻保存，还需明确冻融次数。

6.3在核酸分离/纯化过程结束后，应采用适当方法对分离/纯化后的核酸储备液进行质量控制。比如，采用分光光度计法对分离/纯化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的脱氧核糖核酸（DNA）量，而在终体系中需加入25μL的DNA储备液，则在DNA分离/纯化完成后应将DNA储备液的浓度调整至2ng/μL的浓度。

如分离/纯化后的核酸储备液质量（如浓度范围）不符合要求，应重新取材或扩大样本量再进行核酸分离/纯化。

6.4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）。

7.【检验方法】

详细说明试验操作的各个步骤，包括：

7.1试剂配制方法、注意事项。

7.2详述核酸分离/纯化的条件、步骤及注意事项，明确核酸提取的样本体积、核酸洗脱体积、明确提取核酸的质量标准。对照品（质控品）应参与样本核酸的平行提取（如有必要），以对核酸分离/纯化环节进行合理的质量控制。

7.3扩增反应前准备：各组分加样体积、顺序、相关注意事项等。

7.4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。

7.5仪器设置：明确关键参数，待测基因、内标和对照品的荧光通道选择等。

8.【阳性判断值】

包括基线的确定方法和阈值循环数（Ct）的要求（如适用）。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。

9.【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。

10.【检验方法的局限性】

10.1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。

10.2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。

10.3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。

10.4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。

10.5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、核酸分离/纯化试剂、检测方法等）。

10.6 FFPE样本在固定过程中可能引入新的突变，影响检测性能。建议进行评估和通过相应的方案降低假阳性。

11.【产品性能指标】

根据研究资料详述以下性能指标：

11.1对相应国家标准品（如有）和企业参考品检测的符合情况。

11.2最低检测限：说明在试剂盒规定的检测条件及扩增体系中，试剂盒能够覆盖的所有突变类别的最低检出浓度，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；并简单介绍最低检测限的确定方法。

11.3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。

11.4精密度：简要介绍不同机型、不同样本类型的精密度评价方法和结果。(包括重复性、中间精密度和再现性评价结果)

11.5分析特异性

对分析性能评估中特异性研究内容进行归纳。

11.5.1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,至少包括检测上限和检测下限浓度。

11.5.2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。

11.5.3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。

11.5.4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。

11.6临床试验：简要介绍试验方法、对比试剂（方法）信息、受试者及样本、所采用的统计学方法及统计分析结果和结论等。

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》（卫办医政发〔2010〕194号或现行有效版本）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。

三、参考文献

1.体外诊断试剂注册与备案管理办法[Z].

2.体外诊断试剂临床试验技术指导原则[Z].

3.体外诊断试剂说明书编写指导原则[Z].

4.医疗器械临床试验质量管理规范[Z].

5.医疗器械产品技术要求编写指导原则[Z].

6.体外诊断试剂临床试验数据递交要求注册审查指导原则[Z].

7.抗肿瘤药物的非原研伴随诊断试剂临床试验注册审查指导原则[Z].

8.与抗肿瘤药物同步研发的原研伴随诊断试剂临床试验技术指导原则[Z].

9.基于同类治疗药物的肿瘤伴随诊断试剂说明书更新与技术审查指导原则[Z].

10.肿瘤个体化治疗检测技术指南（试行) [Z].

11.李艳，李金明.个体化医疗中的临床分子诊断[M].人民卫生出版社, 2013年8月

12.李金明.《实时荧光PCR技术,第二版.人民军医出版社, 2016。

13. 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础,第二版[M].上海科学技术文献出版社,2007.

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[M]. 北京：科学出版社,2007.

15. Robert F. Weaver. Molecular Biology, 5th Edition[M]. 2011.

16. 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[S].