附件1

《人表皮生长因子受体2基因扩增检测

试剂盒（荧光原位杂交法）技术审查

指导原则》（征求意见稿）

本指导原则旨在指导注册申请人对人表皮生长因子受体2基因扩增检测试剂盒（荧光原位杂交法）注册申报资料的准备及撰写，同时也为技术审评部门审评注册申报资料提供参考。

本指导原则是对人表皮生长因子受体2基因扩增检测试剂盒（荧光原位杂交法）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。

本指导原则是供申请人和审查人员使用的指导性文件，不涉及注册审批所等行政事项，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、标准体系及当前认知水平下制定的，随着法规、标准的不断完善和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。其他未尽事宜（包括产品风险分析资料等），应当符合《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）（以下简称《办法》）等相关法规要求。

一、范围

人表皮生长因子受体2（以下简称HER2）定位于染色体17q12，是表皮生长因子受体（EGFR）的成员之一；HER2基因编码分子量为185kDa的酪氨酸激酶活性跨膜糖蛋白。HER2蛋白主要通过与家族中其他成员形成异二聚体而与各自的配体结合; 当异二聚体与配体结合后，激活酪氨酸激酶的活性。参与细胞的增殖、凋亡调控、血管和淋巴管新生等生物学功能。HER2蛋白的过表达主要是由于HER2基因的扩增，可导致肿瘤细胞内信号通路的异常活化，与肿瘤的发生发展和侵袭转移有关。该情况出现于部分原发性浸润性乳腺癌，胃及胃和食管交界处癌(以下统称胃癌)患者中。

HER2阳性是指免疫组化（IHC）检测结果为(3+)，或原位杂交方法(In situ Hybridization，ISH)检测结果为HER2基因扩增。而免疫组化检测结果为(2+)的病例为HER2不确定，需进一步应用原位杂交方法以进行HER2扩增状态的检测。

对HER2阳性的乳腺癌和胃癌患者进行联合抗HER2靶向治疗（如曲妥珠单抗）使得患者的生存状况得到改善，但是在HER2阴性的患者中没有效果。准确地检测HER2蛋白表达和基因扩增状态是抗HER2单克隆抗体分子靶向治疗患者筛选和疗效预测的前提，对乳腺癌和胃癌的临床治疗和预后判断至关重要。

本指导原则适用于使用荧光原位杂交方法检测手术切除样本和活检样本的组织切片中的HER2基因扩增情况，包括HER2平均拷贝数（单信号）和HER2基因平均拷贝数和该基因所在的第17号染色体着丝粒（CEP17）序列平均拷贝数的比值（双信号）。对于其他应用原位杂交法检测HER2基因扩增水平的亮视野ISH，如显色ISH(Chromogenic In Situ Hybridization，CISH)和银增强ISH(Silver—enhanced In Situ Hybridization，SISH)，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进行修订或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。

二、注册申报资料要求

（一）综述资料

1、预期用途：HER2基因及其家族简介，在相关适应症中的表达情况，与组织病理学特征的关系，其扩增情况与乳腺癌和胃癌治疗方案制定以及预后判断的关系等。对于胃癌用途，建议说明临床应用过程中首先考虑使用免疫组织化学方法检测HER2蛋白的过表达状态，在结果为(2+)的情况下需进一步确定HER2基因的扩增状态。

2、产品描述：荧光原位杂交法（Fluorescence In Situ Hybridization，FISH）的技术原理，目标基因的座位区域，探针的设计原则以及偶联的荧光染料，细胞核复染方式，以及结果判读标准和统计方式等。

3、同类产品上市情况：与相同或相似方法学（如免疫组织化学、其他原位杂交方法、实时荧光定量PCR等）的产品在性能、上市情况和结果判读等方面的比较。

（二）主要原材料研究资料

申请人应验证主要原材料的性能指标符合产品研发、生产和检验要求，以确定设计要求或者外购厂家，并制定主要原材料的质量标准。

1. 探针序列的确定：应包括探针所在基因的位置信息，探针制备所需基因片段序列信息的收集和选择过程，最终确定的探针序列在人基因组中特异性的验证过程等。
2. 探针克隆的构建：应包括载体的选择，阳性克隆的构建与确认，特异性的验证过程等。
3. 探针的制备：应详细描述探针的制备过程，包括聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）产物的获得以及纯化过程，荧光染料标记方式的选择与确认等。
4. 探针的质量控制：控制指标应包括浓度、纯度、杂交效率、特异性等，可使用测定260nm处紫外吸收峰值、测定260nm 与280nm处紫外吸收峰值的比值、聚丙烯酰氨凝胶电泳、使用染色体分散良好的中期相分裂细胞杂交验证等方式。
5. Human Cot-1 DNA：是由大量人类基因组重复序列组成的高浓度DNA，能封闭样品中的DNA重复序列，降低检测背景。要求能有效封闭背景信号，避免由于非特异性杂交而影响检测结果的判读。应评价Human Cot-1 DNA对样本检测背景信号的封闭情况。
6. 脱氧核糖核苷三磷酸（dNTP），氨基-dUTP：应达到HPLC级色谱纯，无DNase、RNase污染。
7. 荧光染料：评价指标应包括最大发射/吸收峰，与探针的结合能力，持续被激光照射时的抗淬灭能力等。另外需评价二脒基苯基吲哚（DAPI）复染液对细胞核的染色能力以及抗淬灭能力。
8. 企业参考品的选择和制备：企业参考品应至少包含阴性参考品、阳性参考品和特异性参考品。应详细说明参考品的来源、组成、制备和保存情况。阳性参考品应使用经已上市产品检测确认HER2基因扩增为阳性的乳腺浸润癌组织，人乳腺癌细胞株；或者胃癌组织，胃癌细胞株。阴性参考品可选择经确认为HER2阴性的人肿瘤细胞株，或者其他来源的HER2阴性肿瘤组织。特异性参考品可选择健康人外周血培养细胞制备，应含有较多染色体分散良好的中期分裂相淋巴细胞。
9. 建议在试剂盒内配制质控片，应至少包含阴性质控片和临界（弱扩增）阳性质控片。建议选择HER2扩增状态确定的细胞株。

（三）主要生产工艺及反应体系的研究资料

申请人应描述主要生产工艺及确定依据，详述工序流程以及各个步骤的质量关键控制点；应着重说明荧光标记探针的稳定性，以及企业参考品和质控品的稳定性质量控制。

另外，应建立合适的反应体系，以平衡最佳检测信号和背景强度的关系。反应过程包括样本预处理和杂交检测两个步骤，样本预处理过程包括样本脱蜡，样本预处理，胃蛋白酶处理三个环节；杂交检测过程包括变性，杂交，杂交后洗涤，DAPI复染四个环节。

1、样本的采集、固定、制片、保存和运输：应对采样部位及方法，固定液成份、标本离体到固定的温度及时间、固定温度及时间，保存和运输的条件和时间的选择进行研究或者验证，结合组织形态及病理学特征，保证样本的准确性以及其中DNA的完整性。另外，切片质量对检测结果的判读十分重要，应对不同的切片厚度进行充分研究，要求检测区域的细胞胞核边界完整、DAPI染色均一、细胞核无重叠、荧光信号清晰。

2、样本预处理：应对预处理温度及时间以及特定盐溶液的离子强度，胃蛋白酶的消化条件进行充分研究，以避免处理过程中组织和DNA的损失造成检测结果出现假阴性。其中预处理过程应至少选择3个温度/时间的组合，胃蛋白酶消化过程应至少选择5个持续时间进行研究。

3、样本变性条件：应对样本变性处理的温度、持续时间的组合进行充分研究，以保证样本中DNA双链的充分解链，有利于后续探针和样本的结合，提高杂交效率以及保证杂交的特异性。应至少选择3个温度/时间的组合进行研究。

4、样本杂交条件：应对样本杂交步骤的温度、持续时间的组合进行充分研究，以达到探针和样本的最佳结合效率。应至少选择5个温度/时间的组合进行研究。

5、杂交后洗涤条件：应对缓冲液的盐浓度和去垢剂成分，以及清洗温度、时间、次数的组合进行充分研究；以达到最佳的杂交严格度。要求尽可能去除样本中的核蛋白等干扰物质，避免非特异性杂交，降低背景干扰，并且增加目标信号的强度。应至少选择5个缓冲液浓度，5个清洗条件的组合进行研究。

（四）分析性能评估资料

申请人应使用多批产品进行研究，建立稳定可靠的性能指标。

1、灵敏度：主要反映产品检测时探针与目标基因位点的结合效率，也称为杂交效率。由于组织固定时蛋白质和核酸产生的分子间交联等对靶核酸具有屏蔽作用，探针穿透细胞的能力不同，导致产品对于不同类型样本的杂交效率存在性能差异；应使用临床应用环境中所有可能的样本类型进行评估。选择至少20个乳腺浸润癌/胃癌病例的组织样本，以及20个癌旁正常组织或者正常人组织样本；对同样数量的中期或间期分裂相细胞随机进行分析计数。每例组织样本应至少检测20个细胞，分析统计染色体上HER2基因位点标记，或者同时显示HER2基因位点标记和第17号染色体着丝粒（CEP17）位点标记的荧光信号的细胞占全部细胞的比例。

另外，应选择至少1个HER2扩增状态为阳性的细胞株，以及1个HER2扩增状态为阴性的细胞株；对上述灵敏度进行验证。

2、特异性：主要反映HER2和CEP17探针对目标序列识别的特异性。建议使用中期分裂相的外周血淋巴细胞进行涂片分析。选择5份以上正常人的外周血培养细胞涂片样本，每例样本应至少检测20个染色体分散良好的中期分裂相细胞，对至少200个靶位点进行分析计数；结合染色体G显带分析，统计细胞核染色体上正确位点的杂交信号占全部杂交信号的比例。应使用标准的细胞遗传学技术识别信号位点，例如染色体形态学分析、-或者染色体区段染色等技术；考察在HER2基因位点（17q11.2-q12）和/或第17号染色体着丝粒位点（17q11.2-q11.1）的特定荧光信号占全部荧光信号的比例。

3、阴、阳性符合率：主要反映产品对不同类型样本中HER2基因的检出能力和特异性。应使用临床应用环境中所有可能的样本类型。对于适应症为乳腺癌的情况，应至少包括乳腺浸润性癌非特殊类型、乳腺浸润性小叶癌、小管癌、粘液癌组织样本等，覆盖组织病理学分级为Ⅱ级、Ⅲ级和Ⅳ级的类型；良性疾病（如腺病及纤维腺瘤等）；以及正常乳腺组织样本 (如成纤维细胞、血管内皮细胞、淋巴细胞、上皮细胞等)。对于适应症为胃癌的情况，应至少包括肠型、弥漫型、混合型（Lauren 分型）组织样本等，覆盖分期为Ⅱ期、Ⅲ期和Ⅳ期的类型；良性疾病（如胃粘膜慢性炎症等）；以及正常胃组织样本（如黏膜上皮细胞、淋巴细胞、间质细胞等）。每种样本类型应设置至少2至3例组织样本，均要求有明确的HER2基因扩增状态临床诊断结果。考察HER2基因位点和/或第17号染色体着丝粒位点杂交信号检测结果与诊断结果的符合情况。

4、精密度：

申请人应充分考虑到配套检测系统以及使用环境的因素：包括荧光显微镜的特征、激发光源及过滤器的性能参数、物镜放大倍数等；以及不同时间、地点、操作人员对结果判读的影响。报告中应包括方案设计、实施过程和试验结果，并明确验收标准（标准差以及CV%）；其中临界值样本和成簇扩增的样本应分别设置验收标准。至少进行以下指标的评价：

4.1批内精密度：选择至少10例组织样本，应包括HER2扩增、HER2无扩增样本以及临界值样本，进行连续切片。由同一操作人员使用同一批次产品进行检测，每例样本重复检测10次，对结果判读的一致性进行分析统计。

4.2批间精密度：选择至少10例组织样本，应包括HER2扩增、HER2无扩增样本以及临界值样本，进行连续切片。由同一操作人员使用多个批次产品进行检测，每例样本重复检测3次/批次，对结果判读的一致性进行分析统计。

4.3日间精密度：选择至少10例组织样本，应包括HER2扩增、HER2无扩增样本以及临界值样本，进行连续切片。在至少3个不同日期，由同一操作人员使用同一批次产品进行检测，每例样本重复检测3次，对结果判读的一致性进行分析统计。

4.3操作人员/阅片人员间精密度：选择至少10例组织样本，应包括中等强度阳性、弱阳性以及阴性样本，进行连续切片。由至少三位操作人员使用同一批次产品进行检测，每例样本重复检测3次/人；每份样本由三位阅片人员进行独立结果判读。对不同操作人员/阅片人员对同一例组织样本检验方法以及结果判读的一致性进行分析。

5、质量控制情况：申请人或者实验室应合理设置质控品或外对照，以对整体操作流程进行质量控制。评价指标应包括细胞结构的完整性，探针杂交信号的强度和位点的准确性，背景荧光强度，可计数信号（单色/双色）的细胞占全部细胞的比例等。每次检测应设置内对照和外对照，其中内对照可为癌旁正常组织，外对照可选择已知HER2基因扩增状态的组织切片，至少包括阳性、临界值以及阴性样本。

另外，建议强调实验室检测相关的仪器设备需定期维护、校验，应建立完善的标准操作规范文件，从事检测的技术人员和病理医师应通过必要的培训和资格考核，做好记录和存档，内部定期对不同批次检测结果进行重复性分析；并积极参加相关的外部质控活动。

（五）阳性判断值确定资料

业界对HER2检测结果的判读标准不断进行着更新【1-4】，申报产品应参考最新版指南性文件建立阳性判断值。申请人应提交申报产品判读规则以及预设阳性判断值所依据的指南性文献资料，并采用具有统计学意义数量的样本对判读规则以及预设阳性判断值进行验证。其中应包含HER2扩增、HER2无扩增样本以及临界值样本。注意应包含一定数量的阳性判断值附近的样本，包括HER2/CEP17荧光信号总数比值在2附近（1.8～2.2），或者每个细胞的平均HER2拷贝数在4～6附近的样本。

首先制定检测结果重复性较好的目标，即HER2平均拷贝数或者HER2平均拷贝数/CEP17平均拷贝数的标准差/CV值验收标准，确定初始统计细胞数量，并在结果不确定时纳入更多区域或数量进行统计。建议选择细胞核大小一致、胞核边界完整、DAPI染色均一、细胞核无重叠、荧光信号清晰的细胞，随机计数至少20个细胞核。

然后选择已上市的同类产品进行方法学比对研究，分析统计阴阳性符合率和总符合率，并进行一致性检验。必要时应使用采用免疫组化方法学的已上市产品进行同步检测，着重评价被考核产品对免疫组化结果为疑似过表达（HER2（++））样本的HER2基因扩增状态的检测能力。

（六）稳定性研究资料

根据本产品特性，申请人应分别从实时稳定性、运输稳定性、开瓶/冻融稳定性，以及使用过程中的杂交后信号稳定性、探针的光照稳定性等方面对产品的稳定性进行研究，充分考虑在实际的运输、保存和使用条件下对产品性能的影响。其中使用过程稳定性应评价在实际使用的实验室环境条件下，不同的光照条件对探针以及杂交后样本荧光信号强度的影响，注意应覆盖检测的全过程。评价指标应至少包括灵敏度、特异性、精密度、荧光信号强度以及组织形态特征。

样本中核酸的完整性对于结果的正确判读也十分关键。申请人应充分考虑临床样本收集、处理、储存与切片制备等各个阶段的条件，如温度、湿度对样本质量的影响；全面评价临床样本、质控品和企业参考品的稳定性。样本稳定性应分别评价石蜡包埋组织块与组织切片的稳定性，至少包括储存温度及时间。

（七）临床评价资料

1、临床试验机构及人员的要求：

申请人应当选定不少于3家（含3家）临床试验机构，按照有关规定开展临床试验。临床试验机构应获得国家食品药品监督管理总局资质认可。申请人应根据产品特点及其预期用途，综合不同地区人种、流行病学背景等因素选择临床试验机构。临床试验机构必须具有与申报试剂相适应的专业技术人员及仪器设备，并能够确保该项试验的实施。

2、临床试验方案

2.1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实施，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，不得随意干涉试验进程，尤其是数据收集过程。

2.2以图表的形式对试验总体设计及工作流程进行描述。图表中应包括连续切片的数量及用途分配等。

2.3试验方案中应确定严格的病例纳入/排除选择标准，任何已经入选的病例再被排除出临床试验都应记录在案，并明确说明原因。各临床试验机构选用的对比试剂应保持一致，以便进行合理的统计学分析。

2.4试验方案中应明确阅片者、操作者的选择标准。阅片者应选择在免疫组织化学、荧光原位杂交技术应用和乳腺癌/胃癌病理诊断中有丰富经验的医学工作者。

2.5在试验操作过程中和判定检测结果时应采用盲法以保证试验结果的客观性。临床试验研究方案中应详述盲法的具体操作流程。

2.6临床试验前申请人应对临床试验机构参与人员进行相关技术培训，并采用统一判读标准，保持各临床试验机构的判读一致性。注意判读方法与说明书要求一致。

2.7在整个试验中，试验用体外诊断试剂和对比试剂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。临床试验研究方案中应明确质控方法及配合用质控试剂的详细信息。

3.试验方法

3.1“已有同品种批准上市”产品的临床试验

应选择已批准上市，**且已经充分联合药物临床评价的伴随诊断试剂作为对比试剂。**证明本品与已上市产品等效。

3.2新产品

用于胃癌用途的此类检测试剂，目前无已上市同类产品。应选择临床试验机构已建立的参考方法（应可报告肿瘤细胞HER2基因平均拷贝数和肿瘤细胞CEP17平均拷贝数）为参比方法，进行检测结果的一致性研究。**该参考方法应已经充分联合药物临床评价验证。**

3.3临床试验样本的选择和样本量

临床试验应选择经10%中性缓冲福尔马林固定石蜡包埋组织样本或组织芯片。样本例数不低于1000例。其中IHC检测HER2(2+)样本不少于400例。如申报试剂声称可以用于检测两种或两种以上肿瘤类型，则应在一种类型满足上述要求的基础上，对每种新增的肿瘤类型进行不少于**300**例。样本的临床验证，IHC检测HER2(2+)样本不少于120例。

**企业应根据设定的符合率接受标准和选定的统计学方法分别计算总样本例数及IHC检测HER2(2+)样本例数。**样本选择应包含临床预期使用人群和特异性样本，样本应注意包含临床相关常见各种病理组织类型。

对于用于浸润性乳腺癌检测的试剂盒，临床样本应包含临床常见各种浸润性乳腺癌病理组织类型，如乳腺浸润性癌非特殊类型、乳腺浸润性小叶癌、小管癌、粘液癌。特异性样本应包含腺病及纤维腺瘤。

对于用于胃癌检测的试剂盒，临床样本应包含临床常见各种腺癌病理组织类型，如肠型、弥漫型混合型（Lauren 分型）。特异性样本应包含胃粘膜慢性炎。

4.统计学分析

4.1对临床试验结果的统计应选择合适的统计方法，对于本类检测，常选择配对2×2表的形式总结两种试剂的定性检测结果，**分别计算**全部样本的阳性符合率、阴性符合率和总符合率**以及IHC检测HER2(2+)样本的阳性符合率、阴性符合率和总符合率，**选择合适的统计学方法计算95%置信区间，同时对定性结果进行χ2检验或kappa检验，以检验两种检测试剂检测结果的一致性。

由于此类试剂在临床结果的报告中同时报告肿瘤细胞HER2基因平均拷贝数和肿瘤细胞CEP17平均拷贝数（双探针适用）和两者的比值（双探针适用），因此还应对拷贝数的准确性进行评价。用试验用体外诊断试剂及对比试剂（参比方法）肿瘤细胞HER2基因平均拷贝数和肿瘤细胞CEP17平均拷贝数（双探针适用）做散点图的方法，配合适当的统计分析方法，如以线性回归为基础的分析方法或Bland-Altman方法等，评价试验用体外诊断试剂与对比试剂在肿瘤细胞HER2基因平均拷贝数和肿瘤细胞CEP17平均拷贝数（双探针适用）上的检测一致性。

4.2对临床试验中人群基本特征进行分析，包括：年龄、性别（如适用）、病理组织类型、癌症分期情况、免疫组织化学检测结果等（见表1）。

表1 人群基本特征统计表

|  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- |
| 因素 |  | 所占总数比例 | 考核试剂阳性例数 | 对比试剂阳性例数 |
| 性别（如适用） | 男性 |  |  |  |
| 女性 |  |  |  |
| 年龄 | 50岁以下 |  |  |  |
| 50-59岁 |  |  |  |
| 60-69岁 |  |  |  |
| 69岁以上 |  |  |  |
| 组织类型 | 乳腺浸润性导管癌 |  |  |  |
| 乳腺浸润性小叶癌 |  |  |  |
| ....... |  |  |  |
| 临床分期 | II |  |  |  |
| IIIa |  |  |  |
| IIIb |  |  |  |
| IV |  |  |  |
| IHC检测结果 | 3+ |  |  |  |
| 2+ |  |  |  |
| 1+，0 |  |  |  |

4.3 药物联合临床评价部分，以接受药物治疗后的临床试验数据、成功的客观应答率等分析结果，判断检测的安全性、有效性。此部分研究亦可应用kaplan Meier法进行生存数据分析并绘制生存曲线，经Log rank检验差异性，研究检测结果与用药后临床结局之间的相关性。

5.结果差异样本的验证

在数据收集过程中，对两种试剂检测结果不一致的样本，应采用第三方试剂或其他合理的方法进行复核，同时结合组织病理学特征、免疫组织化学检测结果等对差异产生原因进行分析。

6.质量控制

由于检测前预处理步骤较多，导致判读结果可能会在实验人员间、实验室间产生差异。为了客观单一评价试剂性能，尽量减少这种人为差异对最终结果造成的影响，临床试验开始前，各临床试验机构应进行判读一致性试验及统一的质量控制，统一操作步骤，确保同样的样本在不同医院的判读结果保持一致。该预评估内容、实现方法、结果等应在临床试验报告中体现。

7.原始数据

7.1提交病例报告表（Case Report Form, CRF），内容应至少包括：性别、年龄、标本的部位、标本类型、病理诊断结果（包含分级）、免疫组织化学检测结果、HE染色结果、试验用体外诊断试剂检测结果、对比试剂检测结果。所有基于FISH原理的检测结果应包含评估的细胞数量、HER2基因/CEP17荧光信号比值（双探针适用）、每个细胞的平均HER2拷贝数、每个细胞的平均CEP17拷贝数（双探针适用）和定性判读结果。

7.2提交入选样本结果的代表性彩色图片。

8.临床试验总结报告撰写

根据《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的要求，临床试验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。建议在临床试验总结报告中对以下内容进行详述：

8.1 临床试验总体设计及方案描述

8.1.1 临床试验的整体管理情况、临床试验机构选择、临床主要试验人员的选择、人员简介等基本情况介绍；

8.1.2 病例纳入/排除标准、标本的选择例数及标准；

8.1.3 样本类型，样本的收集、处理及保存等；

8.1.4 阴、阳性判读标准、统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准及样本量确定依据。

8.2临床试验具体情况

8.2.1 试验用体外诊断试剂和对比试剂的名称、批号、有效期等信息；

8.2.2 对各临床试验机构的病例数、人群分布情况进行总合，建议以列表或图示方式给出具体例数及百分比；

8.2.3 质量控制，试验人员培训、质控片的检测情况，对检测结果判读的抽查结果评估；

8.2.4 具体试验过程，样本检测、数据收集、样本长期保存、结果不一致样本的验证等。

8.3 临床试验结果及分析

8.3.1数据预处理、差异数据的重新检测或采用其他合理的方法进行复核及无法评估样本的描述处理、试验过程中是否涉及对方案的修改。

8.3.2 结果的一致性分析

计算阳性符合率、阴性符合率、总体符合率及其95%（或99%）的置信区间。采用适当的统计学方法，对定性检测试剂定性结果的检测一致性和拷贝数检测一致性进行评价。采用适当的统计学方法对药物联合临床评价部分数据进行分析评价，研究检测结果与用药后临床结局之间的相关性。

8.4 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，对本次临床试验的特别说明（如有），最后得出临床试验结论。

（八）产品技术要求

拟定产品技术要求应符合《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》的相关规定，按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》（国家食品药品监督管理总局通告2014年第9号）要求编写。

应主要包括以下性能指标：外观、荧光信号强度、灵敏度、特异性、阳性符合率、阴性符合率等。如拟申报试剂已有相应的国家/行业标准，则建议产品技术要求不得低于上述标准要求。如果申报试剂已有适用的国家参考品/标准品发布，则申请人应在产品技术要求中提出检测要求。另外，产品技术要求中应以附录形式明确主要原材料、生产工艺及半成品要求。

（九）产品说明书

产品说明书承载了产品预期用途、检测方法及检测结果解释等重要信息，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，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》（国家食品药品监督管理总局通告2014年第17号）的要求。

结合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，明确说明书的重点内容，以指导注册申报人员更合理地完成说明书编制。

1．【预期用途】

应至少包括以下内容：

1.1试剂盒用于体外定性检测经10%中性缓冲福尔马林固定石蜡包埋乳腺癌和/或胃癌组织切片中HER2基因的扩增情况。用于指导浸润性乳腺癌和/或胃及食管结合部位腺癌的药物治疗和预后评估**（仅乳腺癌适用）**。

1.2明确目标人群:推荐所有乳腺原发性浸润癌原发灶、复发灶与转移灶（如可以获取到足够的样本）都应进行检测；推荐所有经病理诊断证实为胃及胃食管结合部腺癌；新辅助治疗后病灶及复发灶与转移灶（如可以获取到足够的样本）都应进行检测。因肿瘤个体化诊疗发展和研究不断深入，该目标人群可能随着个体化药物和试剂发展研究而发生变化，建议申请人参照最新指南或专家共识设定申报产品的目标人群。

1.3简单介绍HER2基因的生物学特征，如基本结构、编码蛋白及编码蛋白与肿瘤预后判断、用药指导的关系。

1.4 简单介绍与IHC检测之间的关系。

1.5如未进行与具体药物联合评价的临床试验，则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评价。

1.6明确说明该试剂盒仅用于对特定肿瘤患者HER2基因扩增情况的检测，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. 【检测原理】

简述荧光原位杂交技术的基本原理。对特异性结合靶基因；探针序列设计；探针标记染料名称及标记方法；预处理、杂交与复染过程，荧光信号观察、计数和比值计算的方法等内容进行介绍。

3.【主要组成成分】

3.1说明试剂盒包含组分的名称、数量、比例或浓度等信息；质控片（如有）的组织名称。

3.2对检测中使用的探针信息进行简单介绍，包括探针的长度、探针构建的载体。

3.3试剂盒中不包含但对该项检测必需的组份，企业应列出相关试剂、质控片（如适用）的名称与货号；耗材的规格（材质）要求；化学制剂的纯度和浓度（如适用）要求及其他相关信息。

4.【储存条件及有效期】

对试剂的储存条件、有效期、开封稳定性、运输稳定性和冻融次数限制等信息做详细介绍。如试剂盒包含质控片还应在此处明确质控片的稳定性。

5.【适用仪器】

明确配套适用荧光显微镜的配置要求，至少包括对目镜与物镜的放大倍率、光源及滤光片要求。对显微镜配套耗材（如镜油）的要求进行介绍。

6.【样本要求】

重点明确以下内容：

6.1应明确对适用样本的取材、固定、包埋与切片的具体要求。此部分内容可参考国际或国内相关标准操作性文件内容进行编写或引用。注意不同组织类型的样本要求应分开编写。

6.2明确样本的稳定性（包括蜡块与切片）。

7.【检测方法】

详细说明操作的各个步骤：

7.1 明确检测需要的仪器与设备。如烤片机、恒温箱、水浴锅、染色缸、杂交盒等。注明货号及生产商（如需要）。

7.2 试剂配制方法、注意事项，试剂开封、配制后使用方法及注意事项等。

7.3对于手工或半自动检测，详述脱蜡、煮片、消化、固定、核酸变性、杂交、洗涤和复染等各操作步骤。描述应尽量细化，需明确各步骤处理时间、温度、注意事项（如避光）等内容。

7.4 对杂交后载玻片的储存及稳定性、复染后的储存及稳定性进行说明。

7.5质量控制

明确样本检测的内对照使用原则，如“75%以上的肿瘤细胞核中都有杂交信号时，视为检测成功。”

明确每一批次患者样本检测和更换使用新的试剂盒批次时，均应同时进行质控片检测，以监控检测性能并评估信号计数的准确性。如试剂盒内不包含质控片，应明确配套使用的质控片信息，可以为商用质控片也可以为临床检测实验室自制质控片。自制质控片应为已知FISH结果的阴性和阳性质控片，详述质控片的制备方法。

明确质控结果要求（试验有效性的判断），结果允许范围（如适用于不同的仪器或适用于手工与仪器方法，应分别列明结果的允许范围）。

分析质控结果不符合要求的原因并详述处理方式。

7.【阳性判断值】

根据相关指南及规范性文件，以①平均HER2拷贝数和细胞数比值；②HER2基因和第17号染色体着丝粒(centromeric probe for chromosome 17，CEP17)的比值（如适用）的形式明确阳性判断值。

8.【检验结果的解释】

从细胞核形态、探针信号强度、背景情况等多方面，详述载玻片的有效性评估标准。建议对不符合有效性评估标准情况发生时的常见问题及解决方法以列表的形式明确。

明确目标区域的确定方法及仅对肿瘤细胞进行计数的要求；明确对可计数细胞的要求；明确HER2表达情况异质性的处理方法。

以列表的形式详述信号的选择与计数规则，列表应配合清晰彩图图例。

明确细胞计数的具体方法，包括每个样本初始读取细胞数及落入临界值样本的处理方法。如“观察50个计数细胞，统计每个细胞核中的红色信号数量和绿色信号数量，计算信号比值（比值=50个细胞核中红色信号总数/50个细胞核中绿色信号总数），根据以下标准对样本进行阴阳性判断（即判断样本是否存在HER2基因扩增）；信号比值在临界值样本，需另一阅片人另外计数50个细胞。汇总统计100个细胞核中的信号比值（比值=100个细胞核中红色信号总数/100个细胞核中绿色信号总数）。信号比值≥2.0，该样本判定为阳性；信号比值<2.0，该样本判定为阴性。”

9.【检验方法的局限性】

综合产品的预期用途、临床背景、检测方法及适用范围等信息，对可能出现的局限性进行相关说明，主要包括以下描述，请申请人选择适用的条款在产品说明书中予以阐述。

9.1本试剂盒为体外诊断试剂，检测结果的临床判定均应结合患者医疗病史和其它临床诊断结果进行综合评估，不得作为临床诊治的唯一依据。

9.2本试剂盒检测结果受样本来源、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。同时由于结果判断的主观性，可能导致得出假阳性或假阴性的检测结果，使用者应了解检测过程中可能存在的潜在错误、准确性等局限性。

9.3检测结果如与组织病理学特征不符，应核实病理诊断或重新检测。

9.4 本产品的性能指标是基于说明书所述检测程序获得，对该程序进行更改，可能会改变该检验的结果。

9.5本试剂仅对经10%中性缓冲福尔马林固定石蜡包埋的组织进行了验证（如适用），不得用于其它样本类型或流式细胞检测等其它用途。

10.【产品性能指标】

根据分析性能评估研究结果，详述以下性能指标：

10.1 灵敏度：详述在乳腺浸润癌/胃癌病例的组织样本，以及癌旁正常组织或者正常人组织样本中探针与目标基因位点的结合效率。

10.2 特异性：详述HER2和CEP17探针对目标序列识别的特异性。包括研究方法和评估结果。

10.3 阴、阳性符合率：详述在不同组织类型中HER2基因的检出能力和特异性。

10.4 精密度：详述批内精密度及不同检测系统（如适用）、使用环境、时间、地点、检测人员及批次的检测间精密度。

10.5 临床试验数据总结。

11.【注意事项】

应至少包括以下内容：

11.1有关试剂盒内人源组份（如有）生物安全性的警告。

11.2有关实验操作中涉及试剂的安全性提示，包括对有毒有害物质的防护及危险物品的处理方法等。

11.3荧光剂见光容易淬灭。为降低该降解作用，对所有含荧光溶液均应在减少光照情况下保存，包括所有涉及到已杂交载玻片的处理。

11.4要求使用校准过的温度计，以测定溶液、水浴槽和温箱温度。

参考文献

1.《体外诊断试剂注册管理办法》（局令第5号）》，2014年7月30日

2. 《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》，（2014年第16号公告）

3. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》，（2014年第17号公告）

4. Fluorescence In Situ Hybridization(FISH) Methods for Medical Genetics; Approved Guideline MM7-A Vol.24 No.5, 2008

5. Content and Format for Abbreviated 1 510(k)s for Early Growth Response 1 2 (EGR1) Gene Fluorescence In-Situ 3 Hybridization (FISH) Test System for 4 Specimen Characterization Devices, 2014

6. 《胃癌HER2检测指南》，中华病理学杂志，2011年8月第40卷第8期。

7. 《胃癌HER2检测指南(2016版) 》，中华病理学杂志，2016年8月第45卷第8期。

8. 《中国抗癌协会乳腺癌诊治指南与规范(2015版) 》，中国癌症杂志，2015年第25卷第9期。

9. 《乳腺癌HER2检测指南(2009版)》，中华病理学杂志，2009年12月第38卷第12期。

10. 《乳腺癌HER2检测指南(2014版)》，中华病理学杂志，2014年4月第43卷第4期。