运动神经元存活基因1（SMN1）检测试剂

注册审查指导原则

（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对注册申报资料的技术审评提供参考。

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，也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，但需要提供详细的研究和验证资料，相关人员应在遵循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。

一、适用范围

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，主要表现为以四肢近端为主的进行性肌无力和肌萎缩，随着疾病进展，可出现呼吸、消化、骨骼等多系统受累。根据发病年龄、获得的运动功能及疾病进展速度，可将SMA分为四型或五型,从胎儿到成年均可发病，严重程度随发病年龄增加而降低。目前已有治疗药物上市。

SMA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（NG\_008691.1）全长约20kb，共包含8个外显子，转录产物长1.7kb，编码由294个氨基酸组成的SMN蛋白（SMN，NP\_000335.1），在各组织细胞广泛表达，参与剪接体蛋白复合体的组装，是真核细胞生物生存所必须的管家蛋白。

SMN1基因在表型正常人中的拷贝数为1~4个，可包括不同基因型：正常人基因型包括常见的[1+1]型，罕见3~4拷贝SMN1基因的[2+1]型和[2+2]型；携带者通常无异常表型，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型[1+0]型、[2+0]型、[1+1d]和[2+1d]型（d代表SMN1基因内含有微小点突变而功能异常，如无义突变、移码突变、错义突变等）。一般人群中，[1+0][2+0][1+1d][2+1d]基因型的人群频率分别为2.58×10-2、1.09×10-3、4.72×10-4、1.99×10-5。而在肯定携带者人群中[2+0]频率约为4%，[1+1d]频率约为5%。

SMA突变基因型主要有两类，95%由SMN1双等位基因纯合缺失所致，即[0+0]基因型；5%由SMN1复合杂合突变所致，即一个等位基因缺失，另一个等位基因发生微小致病性变异，即[0+1d]基因型。SMN1双等位基因均为微小致病性变异的情况，即[1d+1d]基因型则非常罕见。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。SMN1微小致病性变异在不同种族患者中表现出不同的变异谱系，目前国内外已报道的微小致病性变异约90种（<http://www.hgmd.cf.ac.uk/>），中国患者已报道近30种，其中检测频次≥2，并经美国医学遗传与基因组学学会（ACMG）致病性评估确认的致病性微小变异有7种。在中国人群中最常见的变异为第1外显子的c.22dupA (p.Ser8Lys fs\*23) 以及第5外显子的c.683T>A(p.Leu228\*)，分别约占全部点突变的31.7%和17.1%。

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，尽管其与表型的相关性不完全一致，在国内外管理共识中仍将SMN2拷贝数作为SMA诊断的标准步骤之一。一般携带1个SMN2拷贝的患者是最严重的0型，而携带4个SMN2拷贝数的患者通常为4型，发病晚，病情进展缓慢。但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。

在SMA患者中可以见到SMN1真实缺失、SMN1转换为SMN2导致的SMN1缺失和SMN2增加，或者SMN1真实缺失伴随SMN2重复。SMN1和SMN2的比例，在患者中通常为0：2，也可出现0：3或0：4，当SMN1和SMN2出现部分转换时，患者可出现SMN1~SMN2融合基因，仅出现外显子7缺失而外显子8不缺失。而在一般人群中正常个体的SMN1基因至少为1拷贝，而SMN2基因可以为0拷贝，大多数个体SMN1：SMN2比例为2：2，但SMN1也可以为1拷贝或多于2拷贝。

2019年《脊髓性肌萎缩症多学科管理专家共识》指出临床疑诊为SMA的患者，可以选择基因检测、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。当患者因典型临床症状被怀疑为SMA时，应当首先考虑进行基因检测，基因检测明确的无需再进行肌活检。如果疑诊神经肌肉病，诊断指向不明者，可同时行血清CK、肌电图、神经传导速度检查或肌活检病理检查，有助于鉴别诊断及引导下一步诊断方向。

2020年《脊髓性肌萎缩症遗传学诊断专家共识》（以下简称《遗传学诊断专家共识》）明确SMN1发生双等位基因的致病性变异是SMA诊断的主要依据，临床诊断或者临床疑似SMA的患者均应进行基因检测。基因检测的目标基因为SMN1和SMN2。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，SMN2拷贝数的检测结果作为患者诊断后的治疗、临床管理和预后评估的参考指标。由于在人类基因组中SMN1和SMN2高度同源，需分别针对SMN1和SMN2进行基因检测。SMN1和SMN2全长转录本在外显子7（c840C/T）和外显子8（c.\*239G/A）的差异碱基位点作为区分两个基因座的主要参考位点。由于95%SMA患者为SMN1外显子7纯合缺失，应首先进行SMN1拷贝数定量分析。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。基因诊断明确的患者，其父母有必要进行SMN1检测，以便确定父母SMN1基因型和患者变异基因的来源，并进行遗传咨询。

除了对临床疑似或诊断为SMA的患者进行基因检测外，对夫妇双方进行SMN1基因的携带者检测也是必须考虑的。《遗传学诊断专家共识》指出携带者检测的适宜人群包括确诊为SMA患者的家庭成员以及SMA患者或携带者的配偶这一类高危人群。SMA携带者检测主要针对SMN1外显子7拷贝数，当SMN1外显子7为1个拷贝数时，即为SMA携带者。对于高度怀疑为[2+0]型携带者的，可使用单倍型连锁分析技术进行验证性检测。SMN2不在携带者检测范围。需注意携带者检测的遗传咨询非常重要，检测前需签署知情同意书，在受检者自愿的前提下进行。携带者检测的应用应符合国家及地方卫生管理部门的相关规定。

综上所述，结合目前在国内申报注册的产品均为SMN1检测试剂，本指导原则仅对SMN1检测试剂申报要求进行阐述。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SMN1基因第7和/或第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。针对其他预期用途，申请人应根据产品具体特性进行评价。

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）。SMA传统的检测方法还包括双侧双重等位基因特异性PCR（AS-PCR）、聚合酶链反应-变性高效液相色谱（PCR-DHPLC）、PCR-SSCP、PCR-RFLP、DHPLC、高分辨溶解曲线分析（HRMA）、数字PCR等。多重连接探针扩增法（MLPA）可通过直接检测SMN1拷贝数明确区分患者、携带者或正常人，还可同时检测SMN2的拷贝数。定量聚合酶链反应法（qPCR）则以管家基因序列为内参，采用Taqman探针法分别对SMN1第7或第7、8外显子拷贝数进行相对定量来判断是否发生缺失变异。但两种方法均不能检测SMN1微小变异及[2+0]基因型。

各种方法具体的检测原理存在差异，本指导原则的技术要求是基于PCR探针法方法建立，对于其他检测技术（如MLPA、数字PCR、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进行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。

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。

二、注册申报资料要求

（一）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国内外同类产品上市情况介绍等内容。其中，需注意以下内容：

1.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、流行病学特征及该疾病相关诊断及有效的治疗方法，明确现有方法临床应用的优缺点。提交SMA的基因型分布的背景资料，明确基因名称、基因组位置、基因的转录本号。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、变异检出率以及中国人群数据等, 提交参考的数据库及支持性文献等。企业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。

2.产品描述应详述检测原理、引物探针设计及其与检测位点对应关系,选择依据以及结果判断等。拷贝数分析建议包括外显子7或外显子7和8，明确区分SMN1和SMN2的原理。

3. 同类产品上市情况介绍部分应着重从方法学、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准的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。

综述资料应符合现行有效的《体外诊断试剂注册管理办法》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》。

（二）主要原材料的研究资料

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。

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、反应缓冲液等。申请人应提交相关原材料的选择、制备和质量标准等的研究资料。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。

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。如申报产品不包含提取试剂，则需明确配套的核酸提取/纯化试剂并相应的提取效率的验证资料。

1.2引物、探针

申请人应详述SMN1及内控基因（如适用）的引物、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，此外提供引物探针长度、修饰基团、GC含量、Tm值、扩增产物长度等信息。建议设计多套引物探针以供筛选，针对待测位点的特异性等进行评价，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，PAGE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。

1.3酶

酶包括DNA聚合酶和尿嘧啶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。

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、保存稳定性等的验证资料，以及功能性试验资料，并确定质量标准。

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。SMN1对照品通常至少包括含有0、单拷贝及2拷贝第7外显子和/或第8外显子的对照品。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、细胞系或质粒等。空白对照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、拷贝数确定过程、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。

3.申报产品如涉及校准品或用于拷贝计算的参考样品, 需提供校准品/参考样品的选择依据、原料来源、制备过程、拷贝数及序列确认等的详细研究资料，并提交质量标准建立资料。

4.企业参考品

SMN1拷贝数变异企业参考品主要包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和精密度参考品等，申请人应提交企业参考品的原料选择、制备方法、SMN1拷贝数确认及检验标准的详细研究资料等。同时需包括其他易产生交叉反应的同源序列样本。对于纯合突变型的样本，可采用质粒，对于其他型别的参考品，建议采用临床样本或其核酸溶液。

4.1阳性参考品：可采用临床样本或其核酸溶液，如采用临床样本，则样本类型应与待测样本一致，应包含人基因组DNA。设置参考品时应考虑SMN1和SMN2之间的相互影响。应至少包含0拷贝SMN1（第7外显子或第7、第8外显子纯合缺失）和1拷贝SMN1（第7外显子或第7、第8外显子杂合缺失）。其中SMN1纯合缺失型参考品SMN2拷贝数需大于等于2。

4.2阴性参考品：应包括SMN1正常基因型临床样本或其核酸溶液、不含第7外显子或第7、第8外显子缺失的SMN1正常或突变序列、SMN2不同拷贝数样本及其他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。

4.3检测限参考品可选择最低检测限浓度（例如：95%检出率水平）或接近最低检测限浓度（例如100%检出率水平）的临床样本或其核酸溶液，应包含申报试剂声称可检出的突变类型或基因型。

4.4精密度参考品应至少包括低浓度的SMN1拷贝数为单拷贝（[1+0]）和多拷贝(大于等于2拷贝）的临床样本或其核酸溶液。

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

（三）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、核酸提取纯化步骤、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。

同时反应体系研究资料中应提供可检测的总核酸浓度范围的研究/确认资料。即建议申请人还应对可准确检出的人基因组DNA浓度范围进行研究验证。应对靶标和内标的加样量及扩增效率一致性进行详细研究，需明确样本所需达到的质量标准。

不同适用机型的反应条件如有差异应分别提交。

（四）分析性能评估资料

申请人应提交下述各项分析性能的详细评估资料，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。

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、携带者及患者的不同样本。对于某些稀有基因型，也可采用细胞系等，不建议采用质控品。

1.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.核酸提取/纯化性能（如有）

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、浓度等做充分的验证，并评价该方法能否满足该类产品的要求。

3.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，并需明确样本中SMN1及SMN2拷贝数确定的方法。对SMN1拷贝数的准确性研究应至少包括0，1，2拷贝，同时应在SMN1和SMN2不同比例的背景下对SMN1拷贝数检测准确性进行研究。

4.检测限：SMN1 拷贝检测的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。可采用包含不同SMN1拷贝数的梯度浓度人基因组DNA样本进行多次重复检测，确定适当的检出率水平（如：95%）下的最低人基因组DNA浓度。并采用不同的检测限浓度样本进行验证。

同时，申请人亦应评价申报产品可准确检出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。

检测限评价建议采用临床样本或细胞系，明确临床样本或细胞系与人基因组DNA浓度的对应关系。

5.分析特异性：

5.1应针对微生物、核酸序列相近或具有同源性、具有相似症状临床样本以及其他易引起交叉反应的突变类型序列进行交叉反应研究。说明交叉反应样本的制备方法、核酸序列确认方法，提交详细的验证资料。申请人应对不存在SMN1第7外显子缺失的不同情形（如常见缺失、插入、重复、点突变等变异类型）进行交叉反应研究。

5.2应对SMN1和SMN2之间的交叉反应进行研究，如高拷贝SMN2（4～5拷贝）样本对SMN1的交叉反应、高拷贝SMN2对SMN1的交叉反应以及外显子8对外显子7的交叉反应等。申报产品应能准确特异检出申报基因的涵盖申报范围的拷贝数变异。

5.3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血液样本采集可能用到的抗凝剂和常用药物等。

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。

6.精密度

SMN1精密度评价应至少包含0拷贝、1拷贝及2拷贝的不同临床样本，试验操作完全按照说明书执行，包含核酸提取/纯化等步骤（如有）。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：

6.1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。

6.2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实验以对室间重复性进行评价。

6.3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。

6.4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。

7.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。

申请人应采用不同嵌合比例的模拟SMN1的0、1、2拷贝数嵌合体样本对试剂检测嵌合体的能力进行评估，对不能检测到的模拟嵌合体的嵌合比例进行确认。

（五）阳性判断值确定资料

对于SMN1拷贝数参考区间，建议纳入一定数量的临床样本，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），采用受试者工作特征（ROC）曲线或其他合理的算法进行阳性判断值确定。申请人应详细阐述所选择的算法作为阳性判断值依据的原因（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。需明确所用样本来源、临床背景信息、基因型及拷贝数确认过程及数据。

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。

（六）稳定性研究资料

稳定性研究资料主要包括申报产品的稳定性研究和适用样本的稳定性研究两部分。前者主要包括申报产品的实时稳定性、开瓶/复溶稳定性、运输稳定性及冻融次数限制的研究等；后者则是指适用样本的保存条件和保存时间等的研究。

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。

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。

（七）临床评价资料

临床试验应满足《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》（原国家食品药品监督管理总局通告2014年第16号）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“脊髓性肌萎缩症的辅助诊断”预期用途

本指导原则中针对该预期用途指用于检测SMN1拷贝数变异的试剂。SMN1基因的拷贝数变异检测应至少包括第7号外显子。

1.1临床试验机构及人员

申请人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包括：具有相关症状和/或体征的疑似脊髓性肌萎缩症的患者；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、Prader-willi综合征等）。

临床试验样本一般为抗凝外周血样本。临床样本的采集、处理、保存和提取等应分别满足申报产品说明书、对比试剂说明书（如适用）及第三方试剂说明书（如适用）的相关要求。

1.3临床试验对比方法

如申报产品有已上市同类产品，原则上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。

如申报产品无已上市同类产品，可选择MLPA方法作为对比方法，评价申报产品的临床检测性能；同时，结合临床诊断评价产品的临床意义。应严格按照建立的MLPA方法及相关规定进行临床试验及质量控制。

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。

建议采用单组目标值法估算最低样本量。通过阳性符合率或临床灵敏度估算阳性样本的例数，通过阴性符合率或临床特异度估算阴性样本的例数，同时考虑脱落情况，估算最低样本总量。建议阳性符合率/临床灵敏度和阴性符合率/临床特异度的目标值（临床可接受的最低标准）均不低于95%。

2.针对“携带者检测”预期用途

针对该预期用途，建议至少检测SMN1外显子7拷贝数，不建议检测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

申请人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，并能熟练操作实验。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婚后孕前或孕早期夫妻。

临床试验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要求，并满足产品说明书的要求。

2.3最低样本量和阳性例数

临床试验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基因突变频率进行样本量估算，并在临床试验方案中明确样本量确定的依据。应通过前瞻性临床试验检出一定数量夫妻双方均为携带者的病例和纯合突变病例。评价试剂的阳性预测值和阴性预测值，灵敏度和特异度等。

如前瞻性临床试验纯合突变病例不足，可富集既往样本对纯合突变病例的检测能力进行评价。

2.4临床试验方法

建议采用MLPA方法作为对比方法，前瞻性入组病例，评价申报产品的临床性能。

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应在临床试验方案或报告中明确申报产品、对比试剂和第三方试剂的试验方法。

4.1.2临床试验病例总结表应以列表方式表示，包括申报产品的结果、对比试剂的结果、第三方试剂的检测结果（如有）、临床诊断、年龄和性别等。

4.1.3以交叉表分别总结两种试剂的定性检测结果，选择合适的统计方法进行统计分析，以验证两种试剂检测结果的一致性。

4.1.4 结果差异样本的验证

在数据收集过程中，对于两种试剂检测结果不一致的样本，采用合理方法进行复核，并对差异原因进行分析。如无需复核，应说明理由。

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。

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试剂/方法应保持一致，以便进行合理的统计学分析。另外，申报产品的样本类型不应超越对比试剂/方法对样本类型的要求。

4.3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。

（八）产品技术要求

产品技术要求应符合《办法》、《44号公告》和《医疗器械产品技术要求编写指导原则》（原国家食品药品监督管理总局通告2014年第9号）的相关要求。该类产品作为三类体外诊断试剂，应将主要原材料、生产工艺及半成品要求等内容作为附录附于技术要求正文后。

（九）产品检验报告

根据《办法》的要求，第三类体外诊断试剂申请注册时应提交三个生产批次样品的检验报告。如有适用的国家参考品发布，产品检验应满足国家参考品的要求。

（十）产品说明书

产品说明书应满足《体外诊断试剂说明书编写指导原则》（原国家食品药品监督管理总局通告2014年第17号）的要求，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。下面对该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SMN1xxx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.【主要组成成分】

2.1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。

2.2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/耗材的名称及其他相关信息。

2.3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。

3.【检验原理】

3.1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。

3.2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。

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.【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。

6.【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。

7.【检验方法】

详细说明实验操作的各个步骤，包括：

7.1实验条件：实验室分区、实验环境的温度、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.【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，何种情况进行遗传咨询。

9.【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拷贝数的参考区间分别进行描述。

10.【检验方法的局限性】

10.1对申报产品可检出及不能检出的变异类型进行说明。

10.2 申报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造成的假阴性。

10.3.5 引物探针结合位置发生的多态性或点突变可能导致的假阳性。

10.3.6 其他可能阴性假阳性或假阴性的分析。

10.4对[2+0]基因型、微小突变及SMN1缺失的低比例嵌合体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对相应国家参考品（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：明确可准确定量检测SMN1基因拷贝数变异的人基因组DNA浓度范围。明确可检出的嵌合体样本的嵌合比例范围。

11.6分析特异性：

11.6.1交叉反应验证：同源性序列等交叉反应验证（包括SMN1和SMN2之间的交叉反应及其他同源序列的交叉反应）。

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、起草单位

国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心。