附件

乙型肝炎病毒基因分型检测试剂

技术审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus，HBV）基因分型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审评注册申报资料提供参考。

本指导原则是对乙型肝炎病毒基因分型定性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。

本指导原则是供申请人和审查人员使用的指导性文件，不涉及注册审批等行政事项，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。

一、范围

我国2006年乙型肝炎流行病学调查表明，我国1—59岁一般人群乙型肝炎表面抗原（Hepatitis B surface antigen，HBsAg）携带率为7.18%，5岁以下儿童的HBsAg仅为0.96%。据此推算，我国现有的慢性HBV感染者约9300万人，其中慢性乙型肝炎患者约2000万例；由于不同的乙型肝炎病毒基因型对现有药物治疗可能存在不同的治疗响应，乙型肝炎病毒分型基因检测在慢性乙型肝炎患者治疗中的作用正被越来越多人所关注。

根据HBV全基因序列异质性≥8％的界线，可将其分为不同的基因型。目前，已鉴定的HBV基因型有A—I九种，基因型与血清亚型之间的关系已被清晰论证。基因序列的单个核酸的变化即可能改变血清亚型，但血清亚型不能反映基因的差异。通过对HBV全序列分析发现，在不同基因型之间S区段异质性最大，而型内S区段的异质性最小，从而也可以根据S区基因序列异质性≥4％的标准区分不同的基因型。在此基础上，发展了一系列简单、准确的分型方法，推动了HBV基因型的流行病学及临床相关研究。

基于现阶段研究，在我国HBV以C型和B型为主。HBV基因型与疾病进展和干扰素α治疗效果有关。与C基因型感染者相比，B基因型感染者较早出现乙型肝炎e抗原（hepatitis B e antigen，HBeAg）血清学转换，较少进展为慢性肝炎、肝硬化和原发性肝细胞癌；并且HBeAg阳性患者对干扰素α治疗的应答率高于C基因型；A基因型患者应答率高于D基因型。其他基因型与疾病谱的关系还未有特殊发现。但是，由于基因型分布不均衡和样本大小的影响，还需要作多中心大样本的研究方能进一步了解基因型与疾病谱之间的关系。   
 HBV基因型的分布具有明显的地理学特点，大体上如下：

A基因型主要流行于美国及北欧国家；B和C基因型主要分布在亚洲及远东地区；D基因型在世界各地均有发现,但主要分布于地中海地区；E基因型仅限于非洲；F基因型则分布在中美洲；G、H、I及J型基因型的地理分布尚不清楚。随着时间的推移，新的基因型可能会被陆续发现。

HBV基因分型检测试剂是指利用包括分子生物学相关方法在内的核酸检测技术，以HBV基因序列为检测靶标，对人血清、血浆等样本中的HBV不同基因型进行体外定性检测的试剂。结合临床表现和其他实验室指标，可作为乙型肝炎感染者临床诊疗的辅助指标之一。

本指导原则适用于基于实时荧光（polymerase chain reaction，PCR）方法的HBV基因分型检测试剂，其他方法学的定性检测方法可参照本指导原则，但应根据产品特性确定其中具体内容是否适用，如不适用，应另行选择符合自身方法学特性的技术要求或评价方法。本指导原则适用于进行产品注册和相关许可事项变更的产品。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。

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。若尚无同类产品批准上市，则应详细对该产品的有效性及安全性进行论述，说明理论依据。

提交的资料应符合《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》（国家食品药品监督管理总局公告2014年第44号）的相关要求。

（二）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：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。主要包括以下内容：

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：

2.1脱氧三磷酸核苷（dNTP）

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

2.2引物

由一定数量的碱基构成的特定序列，通常采用（Deoxyribonucleic acid，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。

2.3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。

2.4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。如使用其他工具酶，应提供其详细的研究资料。

2.5核酸类检测试剂的包装材料和耗材应无DNase和RNase污染。

2.6企业内部参考品及试剂内对照（质控品）：

由于乙型肝炎病毒不易培养，制备相应的参考品及质控品时，参考品设置建议采用灭活病毒的血清/血浆。并且参考品及质控品与被测临床样本在整个试验过程中应保持相同的检测方式。

企业内部参考品以及质控品设置必须客观合理，能够充分评价产品的质量。应采用金标准或其他方法对企业内部参考品以及质控品中物质成分进行确认。

2.6.1阳性参考品及阳性质控品

阳性参考品应包含试剂盒所能检测的所有基因型（所有的单基因型以及所有的重组基因型），每个基因型应设置不同浓度水平，应能满足验证产品性能的需要，至少设置两个浓度水平（弱阳性、中或强阳性）；常见基因型（如B型、C型）阳性参考品设置建议采用灭活病毒的血清/血浆。其他基因型阳性参考品设置可采用模拟临床样本。对于阳性参考品的获取方式建议使用金标准的方法或同类方法或者其他能证明问题的方法进行确认。

阳性质控品应包含目标靶基因，用于监控整个检测过程，包括：核糖核酸提取，基因扩增和检测。阳性质控品作为单独检测过程，用于模拟患者样本，用于与患者样本进行同时检测。

2.6.2阴性参考品及阴性质控品

可采用经确认无目标靶基因的序列的样本。阴性参考品及阴性质控品对照物可反映非特异扩增或检测过程，当不存在目标序列时不会得到相关信号。阴性参考品设置建议采用灭活的血清/血浆。阴性质控品应参与样本核酸的平行提取，对假阳性结果进行质量控制。

2.6.3灵敏度参考品（检测限参考品）

灵敏度参考品是评价产品检测能力的重要工具，对于定性产品来说，其设计的合理性显得非常重要。在基因型设置方面，应包括试剂盒所包含的所有基因型。在浓度设置方面，应采用核酸定量的方法对该参考品进行定量检测，明确被测物的具体量值，设置浓度应接近产品最低检出限。

2.6.4精密度参考品

精密度参考品应反映产品检测的重复性以及重复检测的稳

定性，该部分参考品应采用临床样本作为精密度参考品，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。

2.6.5内对照（内标）

与目标靶基因平行提取，扩增；用于对检测管内抑制物造成的假阴性结果进行质量控制。内对照（内标）可采用竞争性或非竞争性的引物设置。

2.6.6其他需要注意问题

如单个产品检验原理为两种方法学或多种方法学联合检测的方法，应对产品中每种方法学均设置参考品及质控品，用于对不同方法学的质量监控，例如：检测原理为PCR-杂交方法联用，在这种情况下，不仅需在PCR环节设置参考品及质控品对扩增过程进行质量控制；同时在基因探针杂交环节也必须设置质控程序对杂交过程进行质量控制。

（三）主要生产工艺及反应体系的研究资料

基本生产工艺主要包括：配制工作液、半成品检定、分装和包装。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、电导率等关键参数进行有效控制。

生产工艺研究的资料应能对反应体系涉及到的基本内容，如样本类型、样本用量、试剂用量、反应条件、校准方法、质控方法、稳定性和有效期，提供确切的依据，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、PCR方法学特性介绍。

4.DNA提取纯化方法优化，建议包含纯化步骤，内标、质控品均应全程参与提取纯化，不建议采用煮沸法进行DNA提取。

5.确定最佳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、样本量、加样量及反应体积等。

6.确定PCR各阶段温度、时间及循环数的研究资料。

7.对于基线阈值（threshold）和阈值循环数（Ct）确定的研究资料。

8.不同适用机型的反应条件的对比分析，如果有差异应分别详述。

如单个产品检验原理为两种方法学或多种方法学联合检测的方法，例如：检测原理为PCR方法和基因探针杂交方法联用。应在上述1至8项基础上完善以下工作：

1.主要生产工艺及反应原理介绍。

2.杂交膜条的制备工艺。

3.确定最佳杂交反应体系的研究资料，包括酶浓度、探针浓度、样本量、加样量及反应体积等。

4.确定杂交各阶段温度、时间的研究资料。

5.交叉污染和携带污染研究。

该类产品适用于检测乙型肝炎病毒感染人群，在临床检测中发现，部分临床样本会出现高浓度的乙型肝炎病毒载量。这部分临床样本在提取过程中增加了交叉污染及携带污染的可能性。在核酸提取过程中，从而导致假阳性的结果。

如产品配套采用自动提取设备提取DNA，在携带污染试验中，建议将高浓度阳性（病毒浓度至少不低于108IU/mL）样本与阴性样本在同一待提取反应板中连续交替排列并应进行不少于5轮上述提取研究。建议试验使用的高阳性样本水平应接近该产品检测能力的上限。以邻近高阳性样本的阴性样本的阴性结果对比未邻近高阳性样本的阴性结果，评估携带和交叉污染的影响。

如产品检测原理中涉及开管检测过程，如自动化膜条杂交仪，应参照该项要求进行验证。

（四）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。如有相应的国家参考品，应在分析性能评估阶段采用国家参考品对产品性能进行验证。建议着重对以下分析性能进行研究：

1.阳性/阴性参考品符合率

所有基因型别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；阴性参考品应按要求检出为阴性。

2.最低检测限（分析灵敏度）

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，应明确各基因型的最低检出限。申报试剂应在最低检出限或接近最低检出限的病毒浓度对说明书描述的所有基因型进行验证。

3.分析特异性

3.1交叉反应

用于HBV DNA分型检测试剂交叉反应验证的病原体种类主要考虑以下几方面可能性：

3.1.1核酸序列具有同源性、易引起相同或相似的临床症状的其他病原体。

3.1.2申报产品中不同基因型以及乙型肝炎病毒其他基因型对被检测基因型的影响。对于难以获得的基因型, 可采用针对该基因型构建的质粒或其他基因工程产品进行交叉验证。

3.1.3建议用高浓度的病原体对乙型肝炎病毒核酸阴性样本进行交叉反应的验证。申请人应提供所有用于交叉反应验证的病毒和细菌的来源、种属/型别和浓度确认等试验资料。

3.2干扰物质

潜在的干扰物质主要包括：内源性干扰物质和外源性干扰物质。

3.2.1内源性干扰物质：样本中常见干扰物质对检测结果的影响，如血红蛋白、甘油三酯、胆红素等。

3.2.2外源性干扰物质：常用抗凝剂，临床常用抗病毒药物如：干扰素、拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定等对检测结果的影响。

3.2.3建议在病毒的检测临界值水平对每种干扰物质的干扰影响进行检测。干扰物浓度的分布应覆盖人体生理及病理状态下可能出现的物质浓度。应注明不同干扰物质对被检测物质无干扰的最高限值。对于不易收集的干扰物质浓度样本可使用临床模拟样本进行调节。

4.精密度  
　　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相关的国外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：

4.1用于精密度评价的样本浓度水平应至少包含阴性、弱阳性和强阳性三个水平。

4.2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。

5.基因混合型的研究

该部分研究主要包括两个目的：一是申报试剂检测不同浓度混合型的能力。申请人应设置不同浓度比例的混合型进行验证。二是申报试剂在判读结果时，是否能够有效区分基因重组型和基因混合型。申请人应设置不同浓度的基因重组型与不同混合比例的基因混合型进行验证。

因理想的不同浓度比例基因混合型样本在临床单位中难以收集，申请人可以使用临床模拟样本进行验证。该部分样本建议用核酸测序明确样本中包含的所有基因型序列，同时应使用核酸定量的方法确定不同基因型的浓度。

如申报产品的结果判读无法有效区分基因混合型与基因重组型，应在产品说明书中进行注明。

6.HBV核酸分离纯化

病毒DNA提取主要有以下目的：富集目的基因浓度、保证目的基因序列的完整性、增加PCR模板溶液均一性、去除PCR抑制物，是决定PCR成败的重要因素之一。企业应对核酸提取的环节做详细的验证。

（五）阳性判断值或参考区间确定资料

阳性判断值确定资料主要指对核酸检测的Ct值进行确认，建议申请人对申报产品用于结果判断的临界值予以确认。参考值范围研究资料样本来源应考虑不同年龄、型别、地域等因素，尽可能考虑样本来源的多样性、代表性。如存在参考值灰区，应提供灰区的确认资料。如采用其他方法对阳性判断值进行确认研究，应说明这种方法的合理性。对于此类试剂，正常人群及其他患病人群中一般不应检出HBV基因型。

（六）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）、运输稳定性、开瓶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3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。

应对样本稳定性进行研究，主要包括室温保存、冷藏和冷冻条件下的有效期验证，可以在合理的温度范围内选择温度点（温度范围），每间隔一定的时间段即对储存样本进行全性能的分析验证，从而确认不同类型样本的效期稳定性。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应在说明书【储存条件及有效期】和【样本要求】项中进行详细说明。

（七）临床试验

1.试验方法

乙型肝炎病毒基因分型核酸检测试剂目前主要供临床医护人员对慢性乙型肝炎患者设置临床治疗方案提供参考依据。随着乙型肝炎基因型与肝炎病情关系的研究工作不断深入，研究方法不断改进，新的研究成果可能将被转化应用于临床工作中。如乙型肝炎病毒基因分型核酸检测试剂用于新的临床用途，应根据新的临床用途特点设置具有针对性的临床试验研究方案。

参比方法的选择可以考虑以下几方面：

1.1 如已有同类产品上市，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。应充分考虑已上市同类试剂的型别选择、靶序列选择、分析灵敏度等特性，确保考核试剂与申报试剂具有明确可比性。

1.2 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。临床试验报告中应对选用的测序方法做详细介绍。

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：

1.2.1 测序方法原理、测序仪型号、测序试剂及消耗品的相关信息。

1.2.2 测序方法所用引物相关信息，如基因区段选择，分子量、纯度、功能性实验等资料。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。

1.2.3 对所选测序方法的分析性能进行合理验证，尤其是最低检测限的确认，建议将所选测序方法与申报试剂的相关性能进行适当比对分析。

1.2.4 测序方法应建立合理的阳性质控品和阴性质控品对临床样本的检测结果进行质量控制。

1.2.5 提交有代表性的样本测序图谱及结果分析资料。

2.临床试验机构的选择

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。建议申请人在选择临床试验机构时，应考虑试验机构之间的地域代表性，临床试验机构应具有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，考核试剂和对比试剂都应处于有效的质量控制下，最大限度保证实验数据的准确性及可重复性。

3.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。

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试验都应记录在案，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。各临床试验机构选用的对比试剂应一致，以便进行合理的统计学分析，同时方案中应明确写明对于对比试验研究中测定结果不符的样本进行确认试验的第三方试剂或方法。

4.临床试验对象选择

4.1基因型方面的考虑

HBV病毒为DNA病毒，其基因具有显著的多样性，不同的地区和民族，HBV流行的基因型不同。境内流行的HBV基因型主要为B型、C型，部分地区存在少数D 型，以及重组型基因B/C型，B/D型，C/D型等。而且，HBV基因型具有一定的地域差异，不同地区流行的HBV基因型也不尽相同。因此，在选择HBV感染者病例时，首先应根据HBV流行的情况，选择能代表我国不同地区流行基因型的HBV感染者病例，以对试剂检测我国流行的HBV病毒的能力进行客观科学的评价，选择的基因型应包括上述三种主要的基因型。

4.2病例选择及样本类型

应涵盖注册申报试剂所声称的所有基因型，应选择部分干扰样本（交叉反应样本），比较干扰组和病例组结果，以便对申报产品的临床性能做出科学的分析。临床试验所需样本总例数不少于500例，其干扰组例数的选择以不超过总临床样本数的10%为宜。对于B型及C型基因型临床样本，应满足每种基因型不少于200例临床样本；对于D型基因型及其他基因型临床样本，建议每种不少于30例阳性病例。每种基因型临床样本应来源于乙型肝炎病毒核酸检测阳性的患者。如注册申报试剂中包含其他基因型，应结合这部分基因型在我国的流行病学特点，临床应用情况等综合因素，对其临床有效性进行科学评估。

在样本选择时，应注重患者来源的不同地域性，不同病情进展，不同药物治疗方案等。对于干扰组样本的选择，应考虑到在检测过程中容易产生干扰，可能造成假阳性/假阴性的情况，以从临床角度考察其分析特异性。

5.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、不同基因型阴性/阳性符合率等。对于本类产品对比试验的等效性研究，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。在临床试验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。

6.结果差异样本的验证

在数据收集过程中，对于两种试剂的检测结果有不一致的样本，如有必要，应采用临床上公认较好的第三种同类试剂或参考方法对结果进行确认，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。

7.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》（国家食品药品监督管理总局通告2014年第16号）的要求，临床试验总结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：

7.1临床试验总体设计及方案描述

7.1.1临床试验的整体管理情况、临床试验机构选择、临床试验主要研究人员简介等基本情况介绍；

7.1.2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；

7.1.3样本类型，样本的收集、处理及保存等；

7.1.4统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。

7.2临床试验具体情况

7.2.1临床试验所用产品的名称、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；

7.2.2对各临床试验机构的病例数、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；

7.2.3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；

7.2.4具体试验过程，样本检测、数据收集、样本长期保存、结果不一致样本的校验等。

7.3统计学分析

7.3.1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；

7.3.2阳性符合率、阴性符合率、总体符合率；

7.3.3以交叉多格表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行多格表χ2检验或kappa检验以验证两种试剂定性结果的一致性。应明确将每种基因型单独进行统计。

7.4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，对本次临床试验有无特别说明，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《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》的相关规定。申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下,根据申请人产品研制、前期临床评价等结果,依据国家标准、行业标准及有关文献，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）的有关要求编写。内容主要包含产品性能指标和检验方法。第三类产品技术要求中还应当以附录形式明确主要原材料、生产工艺及半成品要求。

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。

乙型肝炎病毒基因分型检测试剂的产品技术要求应主要包括以下性能指标：物理性状、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。

（九）注册检验

根据《办法》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总局认可的、具有相应承检范围的医疗器械检验机构进行连续3个生产批次样品的注册检验。对于已经有国家标准品的检测项目，在注册检验时应采用相应的国家标准品进行检验；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。

（十）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、检验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，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。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，翻译应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，明确乙

型肝炎病毒（HBV）基因分型检测试剂说明书的重点内容，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已明确为乙型肝炎病毒核酸阳性患者的血清、血浆等样本中乙型肝炎病毒基因型。辅助医疗专业人员了解病人的乙型肝炎病毒基因型感染情况以及确定适当的治疗方法。

1.2 乙型肝炎病毒基因分型试剂的基因型应至少包括B型、C型、D型，如果申请人略去上述任意一种推荐的基因型，应给出合理的解释。

1.3 适用人群：确诊的慢性乙型肝炎病毒感染者。

1.4 简要介绍乙型肝炎病毒基因型的特征，包括不同基因型的特征、不同基因型常见亚型、不同基因型在地域及人群中的分布情况、不同基因型在临床的应用特点。

1.5 强调该试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为治疗药物调整的唯一依据，临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对患者治疗进行综合判断。

2.【检验原理】

2.1 对试剂盒检测能够覆盖的所有被检测的基因型进行详细描述（靶序列长度及来源区段、基因型类型及相关特征等），对引物及探针设计简介、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 核酸提取纯化的方法、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、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。

3.2 试剂盒中如不包含该项检测必需的组分，说明书中应列出相关试剂/耗材的名称、注册证号（如有）及其他相关信息。

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、注册证号（如有）以及配套仪器等详细信息。

4.【适用机型】

注明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。

5.【储存条件及有效期】

说明试剂盒的效期稳定性、开封稳定性、复溶稳定性、运输稳定性、冻融次数要求等，应标明具体的储存条件及效期。

6.【样本要求】

6.1 样本收集要求：如采集时间、采集顺序等，是否受临床症状、用药情况等因素的影响。结合临床需要并参照慢性乙型肝炎防治指南（现行版）相关要求。

6.2 血液样本应当说明对采血管及抗凝剂的要求：明确样本类型、采血管和抗凝剂，其他样本应说明样本采集、处理及保存方式。

6.3 样本处理、运送及保存：对血液样本离心条件的要求，核酸提取前的预处理、运送条件、保存条件及期限（短期、长期）等。冷藏/冷冻样本检测前是否需恢复至室温，冻融次数的要求。如有需要应对高于检测范围的样本稀释方法进行规定。

7.【检验方法】

详细说明试验操作的各个步骤：

7.1 试剂准备及配制方法、注意事项。

7.2 详述待测样本、质控品核酸提取的条件、步骤及注意事项。

7.3 核酸提取/纯化方法的详细介绍。

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、循环设置及相关注意事项。

7.6 仪器设置：特殊参数、结合探针的荧光素标记情况对待测基因及内标的荧光通道选择。

7.7 基线、循环阈值（Ct值）的选择方法。

8.【阳性判断值或者参考区间】

该类产品用于定性检测，Cut-off值是检测试剂有效区分检测结果阳性和阴性的标准，如产品检测原理为荧光PCR法。Cut-off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，对于接近Cut-off值的弱阳性结果或者接近Cut-off值的阴性结果建议结合扩增结果的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、阴性对照以及反应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。建议将不同结果的典型性图谱纳入说明书中，便于用户对结果的读取。

10.【检验方法的局限性】

10.1 该产品仅用于乙型肝炎病毒核酸检测阳性患者的临床样本检测。

10.2 该产品仅用于不同基因型的定性检测，不适用定量检测。

10.3该产品未包含全部乙型基因型别。该产品仅用于产品说明书预期用途所包含的已知基因型的检测，不适用其他基因型及未知基因型的检测。因此，当本试剂盒检测结果为阴性时，并不能排除被检测者带有乙型肝炎病毒的其他基因位点。

10.4 如申报产品因产品原理导致无法对乙型肝炎病毒不同基因型混合样本和重组型样本进行区别，应在产品说明书中进行注释，帮助医疗专业人员对检测结果进行客观认识。

10.5 模板DNA 质量将影响该产品检测结果。模板DNA 的质量可能受样本来源、采集过程、运输条件、样本处理等因素影响，同时也受DNA提取方法、PCR 仪类型、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等的限制，可能导致出现假阳性和假阴性的检测结果。使用者须了解检测过程中可能存在的潜在风险。

10.6 该产品以乙型肝炎病毒基因上的特定DNA 片段为检测靶标，如试剂盒引物与探针结合区出现基因突变，导致检测结果异常，将影响检测结果解释。

11.【产品性能指标】

详述以下性能指标：

11.1最低检出限：说明试剂不同样本类型及不同基因型的最低检出限，简要介绍最低检出限的确定方法以及对最低检出限验证所采用的基因型。如不同基因型之间最低检出限不同，应分别列出。

11.2 精密度/重复性：精密度参考品的组分、浓度及评价标准、评价结果。

11.3 特异性：

11.3.1交叉反应：

易产生交叉反应的其他病原体以及乙型肝炎病毒其他基因型的验证情况，建议以列表的方式表示经过交叉反应验证的病原体名称、型别、浓度等信息。

11.3.2干扰物质：样本中常见干扰物质对检测结果的影响。

11.3.3药物影响：常用抗病毒药物、干扰素等对检测结果的影响，如未进行相关研究也应提供相关警示说明。

11.3.4对比试验研究（如有）：简要介绍对比试剂（方法）的信息、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检验实验室管理办法》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、名词解释

基因型：是指根据不同个体基因序列之间的规律性差异而分成的不同类型，用来描述基因本身的特征。基因型分析可鉴定个体或病毒毒株之间的差异。

四、起草单位

国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心。

