附件 3

遗传性耳聋相关基因突变检测试剂注册技术审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对遗传性耳聋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。

本指导原则是对遗传性耳聋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

耳聋是一种常见的感觉障碍性疾病，耳聋病因复杂，目前研究认为约 60%重度耳聋的发病与遗传有关。遗传性耳聋主要涉

及四种遗传方式：常染色体隐性、常染色体显性、线粒体遗传、性染色体连锁遗传。按耳聋和言语功能发育的关系可分为语前聋和语后聋。言语功能发育之前发生的重度或极重度耳聋称为语前聋，在言语功能发育完成后开始的耳聋称为语后聋。一般来说，常染色体隐性遗传性耳聋表现为先天性聋或语前聋，常染色体显性遗传耳聋多表现为语后聋或渐进性听力下降。药物性耳聋、大前庭水管综合征等遗传性耳聋也可表现为后天迟发性。遗传性耳聋根据是否伴有多个系统病变分为综合征型耳聋与非综合征型耳聋，综合征型耳聋一般除了听力损伤外还伴有其他器官系统异常，表现为多种表型，与非综合征型耳聋相比其遗传背景更为复杂。目前遗传性耳聋中约有 30%为综合征型耳聋，70%为非综合征型耳聋。其中，非综合征型常染色体隐性耳聋最常见，约占 80%。

耳聋具有显著的遗传异质性，不同的种族中常见的致聋基因不同，进化过程造成了人种间遗传差异、人群迁徙和血源融合又导致了局部地区人群遗传背景的复杂化，中国耳聋人群中基因突变热点、突变谱、表型与基因型对应性与其他人种耳聋人群存在一定差异。在我国，约 70%的遗传性耳聋变异来自于 GJB2、SLC26A4、GJB3 及线粒体 DNA 12SrRNA 等 4 个常见致聋基因。目前常规建议进行的检测位点主要涉及 4 个基因的 9 个突变位点，具体为 GJB2 基因：c.35delG、c.235delC、c.176-191dell6 和 c.299-300delAT；SLC26A4 基因：c.2168A>G 和 c.919-2A>G（IVS7-2A>G）；GJB3 基因：c.538C>T；12SrRNA 基因：

m.1494C>T 和 m.1555A>G。各位点相关情况如下：

GJB 2 基因：GJB2 基因位于人类染色体 13q11-12，其基因短小，包含 2 个外显子，编码 226 个氨基酸，编码缝隙连接蛋白 26，耳蜗缝隙连接蛋白的作用是维持内耳钾离子平衡，同时在内耳的生理功能中发挥非常复杂的作用，包括参与第二信使的转运及耳蜗内电位的产生。目前已发现的 GJB2 基因致聋突变超过 200 个，是迄今为止在多个人种中最常见的致聋基因，国外研究认为常染色体隐性遗传性耳聋患者中，约有 50%由 GJB2 基因突变引起。但是该基因致聋比例在不同人种中存在差异。其主要突变方式为缺失，其中，c.235delC 是中国人群中发生频率最高的突变，其他位点还包括 c.299-300delAT、c.176-191del16、c.35delG 等。

SLC26A4 基因：又称 PDS 基因，位于人类染色体 7q31,含有 21 个外显子，编码离子转运相关蛋白，在机体离子成分平衡的维持中发挥重要作用。该基因突变是导致前庭水管扩大（EVA）的责任基因，EVA 是与儿童感音神经性聋相关的最常见的内耳畸形，大部分 EVA 患者变现为非综合征型耳聋（DFNB4），少部分同时合并甲状腺肿大，称 Pendred 综合征。对于该类患者往往变现为迟发性、渐进性，头部碰撞、感冒等会引起颅内压变化的活动都可能会引起听力下降。在我国，约 96%的前庭水管扩大患者由 SLC26A4 基因突变导致，中国耳聋人群中该基因突变检出率为 20.35%，目前发现的该基因致病突变众多，突变位点及突变频率存在地域和种族差异，在中国 c.919-2A>G、c.2168A>G

为携带频率最高的 SLC26A4 基因热点突变，其次还有 c.1229C>T、c.1975G>C、c.1174A>T 等。突变等位基因按外显子排名由高到低为：外显子 7+8、外显子 10、外显子 19、外显子 17、外显子 15。发生在上述外显子上突变约占 90.61%。

GJB3 基因：位于染色体 1p35-p33，编码缝隙连接蛋白 31，是国内发现、克隆并鉴定的第一个耳聋相关基因，可以引起常染色体显性或者隐性遗传。主要突变形式有 c.538C>T 的无义突变和 c.547G>A 的错义突变，其可能与语后高频听力下降相关，目前国外对 GJB3 基因突变引起耳聋的报道较少。

线粒体 DNA（mtDNA）突变：mtDNA 是存在于细胞质中、独立于核染色体的基因组，由于受精卵所含有的 mtDNA 来自于卵子的细胞质，因此主要为母系遗传。在细胞复制过程中 mtDNA 突变随机分配，母亲-子代突变比例可能差异较大，mtDNA 存在状态阈值，即只有突变型 DNA 达到一定负荷率或 mtDNA 功能缺陷到一定程度才会产生相应表型。由 mtDNA 突变而引起的耳聋包括综合征型耳聋和非综合征型耳聋，其中 mtDNA 12SrRNA 上的 m.1555A>G、m.1494C>T 突变是氨基糖苷类药物致聋的易感位点，突变携带者对氨基糖甙类药物异常敏感，低剂量使用该类药物就可能会出现耳鸣，甚至严重的听力下降。此外，其他 mtDNA 突变还可能引起综合征型耳聋，例如母系遗传糖尿病伴耳聋等。

除上述列举的代表性基因突变外，至今已有众多其他耳聋相关的致病基因被克隆或鉴定，但还有很多耳聋表型的致病基因不

清楚。随着科学发展，可能发现其他意义明确的耳聋表型相关基因和突变位点并应用于临床。

目前，遗传性耳聋基因突变检测在遗传性耳聋的辅助诊断以及新生儿遗传性耳聋基因突变筛查等领域有重要意义。例如通过对具有耳聋症状和/或体征人群，以及其他需要进行耳聋基因突变检测的人群，如有耳聋家族史的人群等进行耳聋基因突变的检测可用于遗传性耳聋的辅助诊断；对新生儿进行遗传性耳聋基因突变筛查，可作为常规物理听力筛查的补充，特别是可发现常规物理听力筛查无法检出的药物性致聋基因携带者和迟发性耳聋基因携带者，从而进行早期干预和指导等。

遗传性耳聋的诊断是一项复杂的工作，诊断流程包含常规诊断的病史采集、体格检查、辅助检查、对先证者及家系成员进行家系分析和遗传性检测等。

结合该类产品临床使用的实际情况，本指导原则的预期用途可为：用于体外定性检测人外周静脉血或干血斑样本中人基因组 DNA 的遗传性耳聋基因突变，用于遗传性耳聋的辅助诊断，或新生儿遗传性耳聋相关基因突变的筛查，具体预期用途应与产品临床验证相对应。

耳聋基因突变检测方法众多，国内应用较多的有高通量测序、飞行时间质谱、限制性酶内切法、荧光 PCR 法、微阵列芯片技术、PCR+导流杂交法等，其具体的检测原理存在差异，目前以仅包含 PCR 扩增反应或后续结合探针杂交反应进行位点检测的试剂盒较为常见，因此，本指导原则的技术要求适用于主要

基于 PCR 扩增类（如荧光 PCR 法、微阵列芯片技术、PCR+导流杂交法）的检测试剂，对于其他检测技术（如 PCR-质谱、高通量测序），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.应明确检测位点的临床意义，尤其是对于新突变位点，应提交关于新增位点的临床意义的行业认可证据（如国内相关指南或专家共识）及支持性文献等，详述位点导致耳聋作用机制、遗传方式、突变后果、突变检出率以及中国人群数据等。

如新突变位点的临床意义未获行业认可，申请人应提供该基因新突变位点与耳聋表型相关的遗传学证据，包括但不限于：耳聋患者和正常人群的等位基因突变频率、耳聋患者家系共分离、生物信息学分析、权威数据库的信息等基于中国人群的充分的研究数据，以及基因突变和表型关系评估的资料，新突变位点应具有明确致病性。

2.详述检测原理、引物探针与检测位点对应关系以及结果判

断等。

3.同类产品上市情况介绍部分应着重从方法学、检验原理、检测的突变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。

综述资料应符合《体外诊断试剂注册管理办法》（原总局令第 5 号，以下简称《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》（原总局公告 2014 年第 44 号），以下简称《44 号公告》的要求。

（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 以及杂交反应过程（如适用）中涉及的其他主要原材料（如标记用酶等）。申请人应提交各组分试剂中涉及的全部主要原材料的来源、筛选研究过程、制备过程、质量控制标准及检验资料等。如为申请人自制，应提交详细制备方法及过程，并应保证工艺相对稳定；如为外购，应注意明确原材料的供应商，并应提交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。

1.2 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，同时应提供引物、探针核酸序列、模板核酸序列及两者的对应情况，

建议设计多套引物探针以供筛选，针对待测位点检测准确性、特异性等功能性指标进行评价，选择最佳设计，注意应提交详细的筛选过程研究数据及分析过程。

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：序列准确性、纯度（HPLC 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。

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。

DNA 聚合酶应具有 DNA 聚合酶活性，无核酸内切酶活性，具有热稳定性。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、浓度等的验证资料，以及功能性试验资料，并确定质量标准。

1.5 杂交用其他主要原材料（如适用）

根据具体产品提交杂交反应涉及的其他主要原材料的选择及验证资料，例如标记用酶/生物素、杂交液试剂中关键原料等，明确其来源及相应的技术指标要求。

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）实现对产品整个反应体系的有效监控。对照品通常包含阳性对照、阴性和/或空白对照，其中阳性对照一般应至少包括代表性的突变位点和突变类型。对于PCR扩增后需要采用探针杂交进行位点检测的试剂，还应建立对杂交过程的质控体系。

如该类产品所采用的方法学和检验原理显示：无论检测何种样本（野生型、杂合/异质突变和纯合/均质突变），其反应体系均可报出核酸序列结果，均可对检测的假阴性结果进行质量控制，则无需另外设置内标；否则，试剂盒应另外设置内标。

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。阴性/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来源、选择、制备、基因序列确认等的详细研究数据，并对其检测结果做出明确的范围要求。质控探针/点涉及的主要原材料参照前述1.2及1.5进行。

3.企业参考品

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来源、选择、制备方法、基因序列确认及检验标准的详细研究资料等。

3.1 阳性参考品：阳性参考品应包含所有位点的突变型（至少包含杂合型），参考品建议采用临床样本、细胞系或临床样本提取的基因组DNA制备，需提交详细的细胞系构建资料，样本应明确其来源及型别确认资料。

3.2 阴性参考品：建议包括野生型临床样本，可能产生交叉

反应的同源序列（如有）以及检测范围外其他检测位点。参考品样本要求参照阳性参考品，如涉及纳入检测范围外其他罕见型别也可采用质粒。

3.3 检测限参考品：浓度水平可选择最低检测限附近水平，应包含所有位点的突变型（至少包含杂合型），对于线粒体突变，还应包含最低检出异质性比例。参考品样本要求参照阳性参考品进行。

3.4 精密度参考品：建议至少包括低浓度水平的代表性的突变位点和突变类型（覆盖所有突变基因型）。参考品样本要求参照阳性参考品进行。

（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应提交工作液配制（引物、探针浓度、酶浓度、dNTPs 浓度、缓冲液离子浓度等）及其分装和冻干（如有）、荧光标记（如有）、杂交芯片/杂交膜的制备（如涉及）、杂交过程所需的杂交液、显色液及相关缓冲液（如涉及）等工艺过程中各参数详细的选择及确认依据。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。

反应体系研究资料应提交反应条件的选择确定过程，包括样本采集、预处理（如有）、样本用量、试剂用量、PCR 反应体系、杂交体系以及其他检测过程中涉及的反应条件/参数等的确定。如申报产品包含核酸分离/纯化试剂，应提交对核酸分离/纯化过程进行的研究资料。

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 浓度上限进行研究验证。

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

申请人应针对下述各项分析性能提交详细的评估资料，包括试验地点、适用仪器、试剂规格、批号、试验方法、试验样本（类型、来源、数量、处理方法、基因型和浓度确认等）、可接受标准、统计方法、试验数据及结论等。分析性能评估的实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。

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（如外周血和干血斑）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

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、浓度等做充分的研究验证，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。

3.检测准确性

应采用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，应包含所有位点突变型，至少包含杂合型样本，尽量纳入纯合型样本，对于线粒体突变，应尽量纳入异质型。同时建议考察对复合突变样本/人工构建质粒的检出能力。

提供所有试验用样本来源、型别确认等试验资料。

4.最低检出限

该类产品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，能够检出目标序列的最低人基因组 DNA 的浓度，如包含线粒体突变，还应考察特定核酸浓度下的最低可检出的突变比例（异质性比例）。

最低检测限确立：可采用常见突变类型的临床样本，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。

最低检出限的验证：应对试剂盒涵盖的所有的检测位点进行检出能力的验证，至少包含所有位点杂合型临床样本。

对线粒体突变还应考察研究特定核酸浓度下的最低突变比例（异质性比例），研究时可采用均质突变与野生型混合制备系列不同异质性比例样本，考察在各固定核酸浓度下不同异质性比例的检出情况，并确定出可满足最低核酸浓度下可检出的最低异

质性比例，应至少包含20次重复检测，达到95%的检出率。

应提供所有试验用样本来源、型别及浓度（含异质性比例）确定的方法等试验资料。

5.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。

5.1 交叉反应：应针对野生型、非人类基因组、核酸序列相近或具有同源性、以及其他易引起交叉反应的突变类型序列（如待测位点附近的其他突变位点、其他耳聋基因等）进行交叉反应研究。同时申请人还应验证检测范围内各基因及突变位点间的交叉干扰。申请人应提交交叉反应基因的选择依据（如耳聋基因背景、发病情况），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。

5.2 干扰试验：应针对可能的内源和外源性干扰物进行研究。内源干扰物主要涉及血脂、胆红素、血红蛋白和白蛋白、胆固醇等，外源干扰物主要包括血液样本采集可能用到的抗凝剂、常用药物干扰等。针对不同样本类型，建议分别进行相应的干扰研究。

干扰试验可采用配对比对的方式，比较干扰样本和不包含或含正常浓度水平干扰物样本检测结果间差异。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。对于线粒体突变，建议考察最低异质性比例下的干扰。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

精密度评价应至少包含野生型及常见代表性突变位点和突变类型（覆盖所有突变基因）的临床样本。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）。此外，如产品包含多个反应管，建议每个反应管均应进行精密度研究。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建议包含最低检出限水平和中/高浓度。最低检测限水平下，检出率应≥95%（n≥20）;中/高浓度水平下，检出率应≥100%（n≥20）。

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

7.提供企业参考品验证资料：根据主要原材料研究资料中的企业参考品设置情况，采用三批产品对企业参考品进行检验并提供详细的实验数据。

（五）阳性判断值确定资料

建议申请人采用一定量的临床样本，结合产品特性采用受试

者工作曲线或其他合理方法对申报产品用于结果判断的标准/临界值进行研究确认。阳性判断值研究应涵盖野生型和所有检测位点的突变型（至少纳入杂合型）。同时应提供内标（如适用）的研究资料。

对于某些检测方法学，阳性判断值研究可能不适用，申请人应说明理由。

应提交详细的研究方案（包含临床样本的来源、型别确认等资料）、试验数据和统计分析过程。

（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。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。

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

（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“遗传性耳聋的辅助诊断（遗传诊断）”预期用途

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样本类型

具有耳聋症状和/或体征人群，以及其他需要进行耳聋基因突变检测的人群，如有耳聋家族史的人群等。

临床试验所用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试剂说明书、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。

如申报产品的样本类型包括抗凝外周血以外的其他样本，如干血斑，请确认该样本类型的预期用途是否为遗传性耳聋的辅助诊断，入组人群是否与其预期用途一致；如不同，则应选择其适用人群进行相应预期用途的临床试验。

1.3 临床试验方法

1.3.1 已有同类产品上市的申报产品

对于已批准的遗传性耳聋相关基因突变位点，原则上应选择已上市同类产品作为对比试剂，对比试剂应涵盖考核试剂的检测位点，以此评价申报产品的临床检测性能。

1.3.2 无同类产品上市的申报产品

1.3.2.1 如新突变位点的临床意义已获行业认可（如：国内相关指南或专家共识），且上述认可基于充分的中国人群的临床研究数据，则临床试验可选择参考方法（如一代测序法）作为对比

方法，评价新突变位点的临床检测性能。除此之外，还应提交新位点临床意义已获行业认可的相关证据，该部分资料可在其他临床证据中提交。

1.3.2.2 如新突变位点的临床意义未获行业认可，申请人首先应提供该基因新突变位点与耳聋表型相关的遗传学证据，包括但不限于：耳聋患者和正常人群的等位基因突变频率、耳聋患者家系共分离、生物信息学分析、权威数据库的信息等基于中国人群的充分的研究数据，对基因突变和表型的关系进行评估，具有明确致病性的基因突变位点方可纳入。

临床试验应包括两个目的，新突变位点的临床检测性能评价和临床意义评价。新突变位点的临床检测性能评价可参考1.3.2.1；新突变位点的临床意义评价应分析基因型与临床表型的相关性，基因型与表型的相关性可通过随访或其他临床验证资料来证明。建议同时对所检出携带新突变位点的耳聋患者进行家系分析。

1.4 最低样本量和阳性例数

临床试验样本量应采用适当的统计学方法进行估算，并详细描述所使用统计方法及各参数的确定依据。

临床检测性能评价的样本量估算可分为以下几种情况。

建议采用单组目标值法分别估算临床试验的最低样本量，通过阳性符合率和阴性符合率来分别计算所需阳性样本和阴性样本的例数，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）建议

均不低于 95%。

对于常见突变位点，其阳性总例数应具有统计学意义，建议纳入一定的纯合突变（如 GJB2 的 c.235delC、SLC26A4 的 c.919-2A>G 等）。

对于罕见突变位点，阳性样本也应有一定的例数。

对于同时申报外周血与干血斑两种样本类型的产品，其临床试验每种样本类型应单独统计，满足上述要求。

2.针对“新生儿遗传性耳聋基因突变的筛查”预期用途

针对上述预期用途，本指导原则基于目前的认知水平进行了阐述，不尽之处申请人应根据产品特性，充分考虑申报产品的临床性能研究需求，设计科学合理的临床试验并进行评价。

申请该预期用途的申报产品，其检测的基因及突变位点，均应为已得到行业内公认的、与遗传性耳聋具有明确致病性关系的基因位点。新生儿遗传性耳聋基因突变筛查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

应选择至少 3 家临床试验机构。临床试验机构的选择应尽量考虑拟申报产品的特点和预期用途选择具有相关资质的机构（各地卫生健康部门指定的进行新生儿耳聋基因筛查的临床机构）。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。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

如预期用途为新生儿遗传性耳聋基因突变的筛查，则适用人群为新生儿。

临床试验所用样本一般为干血斑样本。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。

根据临床发病率、临床诊治情况及其他因素综合考虑，对于我国相对常见的遗传性耳聋突变位点，如 GJB2 的 c.235delC、c.299_300delAT、c.176-191del16，SLC26A4 的 c.919-2A>G、c.2168A>G、线粒体 DNA 12S *rRNA* 的 m.1555A>G 突变等，应通过前瞻性临床试验检出突变病例，总例数应满足统计学要求；其他人群突变率相对更低的突变位点也应尽可能在前瞻性临床试验中检出。

2.4 临床试验方法

建议临床试验采取前瞻性入组病例的形式，考核试剂对所有入组病例进行检测，病例基因变异状态采用临床参考标准（如：一代测序法）进行确认，评价考核试剂的临床性能。临床试验过程中，对于先天性耳聋患者等，应提供病例的临床诊断结果，临

床诊断结果应有充分的依据，如采用现有条件下公认的、可靠的、权威的疾病诊断标准，疾病诊疗指南中明确的疾病诊断方法，行业内的专家共识等。

申请人还应同时选择已批准上市、临床普遍认为质量较好的同类产品或参考方法作为对比试剂，与考核试剂进行一定例数的比较研究试验，以评价考核试剂的临床准确性。此部分验证位点应涵盖申报产品的所有突变位点。此部分研究可使用部分已确诊（回顾性）的阳性病例进行研究。应在试验方案和报告中对病例选择的方式和原因进行明确的说明。

应针对筛查用途的验证和准确性验证，分别进行统计分析。

3.如有其他预期用途，也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 临床试验数据汇总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）、年龄、性别、临床诊断以及临床背景信息（新生儿筛查应提供新生儿听力筛查结果。用于辅助诊断时，具有耳聋症状和/或体征的人群应提供必要的听力学及影像学检查结果：如声导抗、ABR和 DPOAE，必要时提供 CT 或 MRI 结果）。

4.1.3 以四格表分别总结考核试剂与对比试剂/方法的定性检

测结果，选择合适的统计方法进行统计分析。除总体统计外，还要针对每一个突变位点进行统计分析，同时纯合突变以及杂合突变（或均质突变和异质突变）应分别进行统计分析，以验证考核试剂与对比试剂/方法检测结果的一致性。

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制定应基本一致，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。

4.4 其他

如申报产品可适用《用于罕见病防治医疗器械注册审查指导原则》，则具体要求可参照该指导原则。

（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。

如有行业标准，产品技术要求的相关要求应不低于行业标准的要求。

（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连续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 本产品用于体外定性检测人 XX 样本基因组 DNA 中的遗

传性耳聋基因XX（列举具体的检测基因及位点）突变。

1.2 本产品用于遗传性耳聋的辅助诊断。检测结果仅代表对患者的遗传性耳聋相关基因位点的检测，仅供临床医生参考，不能作为诊断遗传性耳聋的唯一依据，临床医生应结合患者其他诊断信息对检测结果进行综合判断。

如用于新生儿遗传性耳聋基因突变的筛查，预期用途可表述为：本产品可用于新生儿遗传性耳聋基因突变的筛查。其检测结果仅代表对新生儿的遗传性耳聋相关基因位点的检测，关于新生儿遗传性耳聋的诊断，应依据相关的诊疗流程。

1.3 介绍耳聋相关的临床背景信息及实验室诊断方法等，介绍被测靶标（突变位点）的相关情况，说明各检测位点的临床意义。

2.【检验原理】

对试剂盒的技术原理进行详细介绍，建议结合适当图示进行说明。对试剂盒所用探针、引物及突变的判定等进行详细描述，对不同样本反应管组合（如涉及）、杂交芯片/杂交膜设计（如涉及）、对照品设置及荧光信号检测原理等进行说明。

3.【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。

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、产品名称以及医疗器械备案号等详细信息。

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。明确开瓶稳定性、冻融次数限制等内容。

5.【样本要求】

样本的采集、处理、检测要求、运送和保存：明确样本采集、核酸提取纯化方法、DNA 纯度及浓度/浓度范围要求、样本及核酸提取液的保存要求，包括具体的保存条件及期限等。

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，应注意需明确提取核酸的浓度及纯度等质量要求。

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 杂交及显色体系（如涉及）中各步骤所涉及的反应时间、温度仪器设置及其他步骤参数。

7.7 最终检测及结果判读过程。

8.【阳性判断值】

简要概述阳性判断值具体判断标准及研究验证情况。

9.【检验结果的解释】

结合对照品、样本管/杂交芯片/杂交膜（如涉及）检测结果以及检测类型，以列表/图片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。

10.【检验方法的局限性】

10.1 申报产品仅对下述突变位点和突变类型 XX 进行了验证。

10.2 有关假阴性结果的可能性分析

10.2.1 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。

10.2.2 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 该产品不能涵盖与遗传性耳聋相关的全部位点，未检出突变不能排除携带其他突变位点。

11.【产品性能指标】根据分析性能研究资料，编写概述以下性能指标：

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，包括线粒体突变最低检出异质性比例。

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 分析特异性

11.5.1 交叉反应验证：交叉反应验证情况。

11.5.2 干扰物质验证：样本中常见干扰物质对检测结果的影响。

11.6 企业内部参考品符合率。

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。

三、起草单位

国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心。

医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED
hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES
医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER
医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE
MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE