

肿瘤相关突变基因检测试剂（高通量测序法）

性能评价通用技术审查指导原则

一、前言

本指导原则旨在指导注册申请人对肿瘤相关基因检测试剂分析性能评价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。

本指导原则是针对肿瘤相关基因检测试剂分析性能评价的一般要求，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，亦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，但需要详细阐明理由，并对其科学合理性进行验证，提供详细的研究资料和验证资料，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。

二、适用范围

本指导原则所述肿瘤相关基因检测试剂分析性能评价主要是指基于高通量测序（**high-throughput sequencing**）即下一代测序（**next generation sequencing, NGS**），又称为大规模平行测序（**massively parallel sequencing, MPS**），体外检测人体组织中肿瘤细胞中肿瘤相关基因变异。用于检测体细胞突变的 **NGS** 正在广泛用于肿瘤诊疗相关的分子检测，包括对特定基因的 **DNA/RNA** 进行测序，以寻找与肿瘤临床诊疗相关的突变基因的改变。肿瘤基因突变类型包括点突变、插入、缺失、基因重排、拷贝数异常等广义的基因突变。

基于 **NGS** 测序原理的 **IVD** 检测可能包括以下步骤：样本收集，处理和保存、**DNA** 提取、**DNA** 处理、文库制备、测序和碱基识别、序列比对/映射、变异识别和过滤、变异注释和解读以及检测报告的生成。同时，某些产品还可能会包括软件部分，但上述相关步骤并不一定被全部包括，应根据产品的具体设计流程来进行判断。对于每个检测步骤，申请人需要结合产品设计和临床意义来建立特定的可接受的质量评价指标和合格判断标准。此外，为满足产品特定预期用途，申请人需通过科学和适当的检测性能研究来确定适用的

试剂，消耗品，仪器和软件。基于上述考虑因素，NGS 检测产品的设计和工作流程中的任何差异均可能导致结果的不同，因此申请人需要清楚地描述相关检测性能指标。

分析性能评价的初衷在于提出产品性能有效性、安全性相关问题的假设，然后通过研究进行确认。NGS 在测序通量及发现未知基因变异方面具有优势，但是在 NGS 技术应用需求及使用中存在包括相关临床样本收集处理、NGS 检测内容、测序流程、数据分析、结果报告、技术质量认证和验证等各方面的挑战。

本指导原则将重点关注实体瘤中检测具有临床意义的体细胞变异并确保高质量的测序结果。申请人应以患者的利益为中心，充分整合临床肿瘤学家对于精准诊治的观点，并充分考虑在我国推广应用的可操作性。申请人可采用多样化的靶向基因组合检测。由靶向基因组产生的信息可能会被用于诊断分类，指导治疗决策，和/或为特定肿瘤提供预后评价，不同产品包含的基因数量可能存在较大差异。

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。本指导原则不适用于基于胚系来源检测，全外显子检测，肿瘤突变负荷（TMB）检测，非靶向测序，从头测序、微生物感染辅助诊断、游离 DNA 检测、直接面向消费者测序、胎儿检测、微生物基因组鉴定和药物耐药性检测、胚胎植入前检测、疾病风险（含遗传风险）评估与预测、RNA

直接测序、筛查、独立诊断目的、肿瘤基因组测序、健康个体测序检测。

三、NGS性能评价

(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。

作为 IVD 检测一般原则，申请人应首先定义申报产品的预期用途和检测性能，产品的预期用途将直接影响检测设计和检测性能以及测序和/或报告的基因类型。申请人需要前瞻性地确定应进行的研究指标（例如准确性）以及每种研究指标应该满足的标准。在设计和开发完成之后，验证研究其是否满足预定义的性能。如果检测不符合任何预定义的性能标准，则应该修改并重新验证。通过反复的设计，开发和验证，直到检测满足设定需求。在整个过程中，申请人需要记录所有研究方案，研究过程和结果，以及每项研究设计的理由。申请人应列出检测样本水平相关参数，建议以列表形式明确，详见附表 1

申请人应提供整个检测流程 SOP 文件，对 NGS 技术检测全过程包括的样本收集处理、文库制备、测序、数据分析、结果报告等过程进行详细描述。生物信息学分析方面描述和记录数据处理和分析，包括变异识别，过滤和注释的所有过

程。明确所有要使用的软件，包括来源（例如，内部开发的以及第三方的）以及任何修改。建议以列表形式描述所有需要的软件和/或数据库名称及其功能。

申请人在计划开发一个有针对性的基因检测试剂时，需确定其预期用途和待测基因数量，包括将要检测的样本类型、适用人群以及哪些类型的检测信息将被评估和报告。还应考虑影响检测的设计，验证和质量控制的其他因素。并在试剂组成说明书中应详细说明该产品包含的试剂组分及需要但未提供的试剂、设备及耗材。

（二）主要原材料的研究资料

NGS 检测过程主要包括样本收集处理、文库制备、测序、数据分析、结果报告等。

1. 样本收集处理（如适用）

样本收集处理过程是保证样本具有能如实反映患者体征的关键环节。申请人需提交涉及样本收集及处理相关试剂主要原材料信息，如样本的运输保存试剂、样本制备试剂、核酸提取试剂的主要组成成分等。

2. 文库制备及测序

测序文库及测序过程主要包含脱氧三磷酸核苷、接头序列、连接酶、聚合酶、逆转录酶、限制性内切酶、引物、探针、接头等；如为申请人自行研究主要原材料，申请人应对测序文库构建的实验过程予以详述；并提供对各主要原材料

的功能性研究。并对制备完成的原料成品进行质量检验以确认其符合标准要求，整个生产工艺应稳定可控。如为申请人外购主要原材料，应详述每一原材料外购方来源，提交外购方出具的每种原材料性能指标及质量控制资料，并详述申请人对外购主要原材料的各指标质量要求以及确定该原材料作为本产品主要原材料的详细依据。核酸类检测试剂的包装材料 and 耗材应无脱氧核糖核酸酶（DNase）和核糖核酸酶（RNase）污染。

3. 生物信息分析及数据库要求

NGS 的数据分析流程或生物信息学流程一般可以分为四个主要操作：碱基识别，序列比对，变异识别和变异注释。明确参考序列类型，辅助测序比对拼接和测序结果确认。不同突变类型可能需要开发不同的变异/突变检测算法。其次，因根据产品设计类型提供软件工具的范围和所需的验证类型。建议申请人提交数据库（参考序列）的溯源信息、数据库类型、完整性、实时性、维护以及升级方案以及分析软件的版本、算法、性能验证以及升级方案等资料。

4. 内部参考品是保证产品性能稳定性以及检测值可溯源的重要构成之一。参考品研究应包括原料选择、制备过程、定值研究、评价指标、统计学分析等。申请人应对内部阳性/阴性参考品的来源、基因序列设置等信息进行精确的实验验证，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。

具体要求如下：

4.1 阳性参考品及阳性质控品：

4.1.1 阳性参考品

理想状态下，阳性参考品应当包括对所申报产品每个基因型的质控样本。但考虑到基于 NGS 技术的可检测基因数量较多，申请人应结合产品预期用途、临床意义及基因类型等因素进行针对性和代表性的设计。

阳性参考品应包含所有需有明确药物治疗用途的基因类型，如对药物使用具有明确指导性的位点的参考品设置，需至少包括不同基因类型中代表性的基因类型，应采用临床样本或细胞系提取的 DNA 储备液作为原料。

对于具有显著临床意义或潜在临床意义的基因，因考虑代表性问题，明确具有临床诊断意义的基因类型及基因型中不同的变异类型，突变频率、变异类型的选取应具有代表性，包括不同外显子，不同基因变异突变等。如检测目标区较大（大于 1M），需对检测区域整体和灵敏度进行质控（特别是针对 SNV），可以采用混合的永生化的正常人白细胞 DNA 储存液（HapMap 细胞系）等。

不同突变/变异的变异丰度及突变频率，浓度范围设置应具有代表性并提供这样设定的依据。阳性参考品的突变形式及拷贝数需采用有效方法进行确认，并明确接受标准。申请人

在设计阳性参考品时可一并考虑检测限参考品的设置及确认方式，并提供相关的依据。

4.1.2 阳性质控品

模仿病人样本的目标核酸序列，并用于质控整个检测过程，包括核酸提取（如适用）、文库构建、测序和数据分析。目前阳性质控检测和分析过程应与临床样本方式一致。

4.2 阴性参考品及阴性质控品

阴性参考品应为 **FFPE** 正常样本的混合物，阴性质控品 **FFPE** 正常样本的混合物或细胞系，应明确不含有目标区域肿瘤突变基因以及目标基因中的胚系突变基因。

4.3 精密度参考品

精密度参考品设置要求可参考阳性/阴性参考品。

4.4 PCR 试剂无模板参考品（NTC）

申请人应建立 **NTC** 对照 **Qubit** 检测接受标准。监测检测过程中是否存在染污。

（三）主要生产工艺及反应体系的研究资料

NGS 检测是一个复杂的工作流程，它由很多独立步骤组合而成。基于 **NGS** 的检测可能包括但不限于以下步骤：样本采集，处理和存储；**DNA** 提取；**DNA** 处理和文库制备；序列读取和碱基识别；序列比对，变异识别，变异注释和过滤，变异评估和注释，以及生成检测报告。一般而言，对于每个检测组成部分，申请人应建立其特定检测的指标和验收标准。

必须对 NGS 每个操作流程的性能表现进行一个内部的验证。每步流程都需要分别优化到一个最佳经验值，以此来综合决定最佳的实验操作条件及各参数的设置。

1. 应能对反应体系涉及到的基本内容，如临床样本用量、试剂用量、反应条件、质控体系设置等，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。

2. 主要生产工艺、反应原理介绍。逆转录过程（如涉及）及最佳反应体系的研究资料，包括酶浓度、引物/探针浓度、dNTP 浓度、阳离子浓度等。确定的温度和时间的研究资料。

3. 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。如包括但不限于核酸体积、质量、浓度、纯度及完整性等。核酸浓度、纯度检测方法包括但不限于荧光法等；核酸完整性检测方法包括但不限于琼脂糖凝胶法、实时荧光定量 PCR 法等。

（四）分析性能评估资料

分析性能评估是反映产品主要原材料选择，生产工艺及反应体系等多方面因素设置是否合理的客观评价指标。检测试剂性能的研究方案应结合产品的反应原理，临床预期用途，使用条件等综合因素进行设计。性能研究应涵盖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。

本部分内容将从 NGS 检验流程中的质量控制要求和主

1.NGS 检验流程

检测方法中，应明确所有检测要素（例如，仪器，软件，消耗品，试剂）和用于检测的实验室设备的检测要素。确定设计方案和标准并详细记录设计研究过程。对于基于 NGS 的检测的每个组成，应该确定规范并记录。记录每个检测组成对于关键因素（例如覆盖率，碱基质量）的局限性。确定并记录基因组的检测区域，包括基因和变异类型，如果关键的测序区域不符合最低性能要求（例如最小覆盖标准），则应修改检测并重新验证以达到最低性能要求。同时，应在产品说明书和/或标签中明确可能影响或限制产品检测性能情形。

1.1 样本制备

申请人需考虑可接受检测的样本类型对检测结果的影响，例如所需采集设备的类型，样本的最小体积或数量，或采集和使用之间样本稳定性必须遵守的任何采集条件。每种样本类型及采集方式应建立相应的 **SOP**，并验证对其整体检测性能的影响。

在 NGS 检测试剂的设计开发过程中，申请人应对配套使用的核酸提取、分离、纯化及富集试剂进行验证并提供验证方案的依据，建议包括但不限于核酸质量、浓度、纯度及完整性等。核酸浓度、纯度检测方法包括但不限于荧光法等；

定量 法等。应明确样品质量（包括但不限于核酸浓度、纯度及完整性）的最低要求并进行质量控制。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。

1.2 测序文库制备

文库制备是产生特定大小范围的 DNA 或 cDNA 片段的过程。申请人应根据不同测序平台的性能特点，对核酸序列进行片段化处理，片段的长短应符合后续测序的要求，片段化方法包括但不限于超声法、酶切法等。申请人应制定核酸序列片段化操作流程及质量控制方案，对经过片段化的核酸短序列的浓度、纯度及片段分布等参数进行验证。

文库制备的关键步骤是在 DNA 片段的两端连接测序接头，接头序列是一段人为设计的序列，包含用于测序过程的多个目的的多个序列组分。如启动测序反应的通用测序引物序列，用于 PCR 扩增引物序列，锚定序列，索引（条形码）序列。如申请人采用自定义序列，应提供设计依据及研究资料。加接头可以是独立的步骤，也可以在靶向序列富集过程中添加。申请人使用条码或标签时，需充分验证并满足测序所需的质量要求，如测序深度、覆盖度等条件。同时，申请人应对潜在的问题进行充分研究，包括但不限于：条码检出率的均匀性、条码互换比率以及条码间相互污染或干扰等因

标签的序列及其位置有详细、清晰的记录。

1.3 测序及碱基读取

目前可用的测序平台具有不同的测序方法，包括联合探针锚定聚合测序法、合成测序和离子半导体测序，以及不同的检测方法。尽管技术性能相似，平台之间也存在差异，特别是不同的 **DNA** 输入量要求，不同的试剂成本，运行时间，读数长度和每个样本的成本。这些差异会影响仪器处理低质量样本的能力，检测插入/缺失的能力以及样本通量。

申请人应根据所选用的测序平台，选择合适的参数指标对测序质量进行监控，制定相应的管理制度及质量标准，并明确失控情况下的纠正措施。申请人应根据具体应用情况，如测序区域的大小及序列特征等因素确定测序所需要的覆盖度及深度。在测序过程中，申请人应建立标准操作流程及质量控制方案监控整个测序过程当中的测序质量。

申请人应根据具体的预期用途，制定产品的测序总体数据量、覆盖度（**read** 数）和深度要求，并提供充分的理论依据及验证结果。申请人应描述清晰，例如，在确立测序深度时需要明确指出是平均测序深度还是最低测序深度；还需要说明测序数据类型，如原始测序数据（原始 **read** 数）、过滤之后的高质量测序数据、去除重复之后的数据计算测序深度。

核苷酸的过程。不同测序平台具有不同的测序偏好性，可影响碱基读取过程中的错误类型与比率。应用软件可以消除或部分抵消测序偏好性的影响，提高碱基读取的准确性。碱基读取后，申请人应对每个碱基读取的质量进行评估。若碱基读取质量有通用标准，则应遵循并引用；若没有通用标准，可根据具体应用情况制定碱基读取质量评价标准及分析方法，并提供充分的理论依据及验证结果。

1.4 生物信息学分析

申请人应对生物信息学分析流程有完整的记录，建立完善的生物信息学分析软件的版本控制方案。申请人应建立生物信息学分析标准操作流程及质量控制方案，保证测序数据的分析、解读及报告的准确性与严谨性。生物信息学分析流程应描述清晰，包括每一步骤使用软件的名称、版本、参数设置要求，包括但不限于以下指标：说明检查每个读段和每个碱基的 Q 值，碱基的频率分布，读长分布及是否存在重复序列和人工序列的评价方法，以保证按照该流程生物信息学分析结果可复现。生物信息学分析应至少报告具有明确临床指导意义的结果。

生物信息学分析一般包括但不限于碱基识别，碱基对比，变异识别和变异注释。根据测序类型和检测报告的变异类型选择生物信息流程，并考虑变异识别和评估流程过程中

程的影响。

1.4.1 数据追踪和记录：软件应自动对样本跟踪以及记录每个测序 **Run** 相关多种数据信息（如：索引（条形码），测序 **run** 记录，样本登记号，患者病例号，样本来源，样本类型，以及测试版本等）

在数据分析不同阶段进行样本状态跟踪；对指定样本进行反复分析跟踪；记录分析中使用的算法以及数据库版本信息；选择的流程输出的文件（如：FASTQ,BAM,VCF 等）以及测序 **Run** 相关统计参数（如，簇密度，簇通过过滤条件比例，未分配序列索引等）。

1.4.2 碱基识别

随着测序循环数的增加，测序数据质量可能因测序系统噪音等问题出现下降，申请人需提供碱基识别的软件资料，包括分析软件可以满足申报产品预期用途的研究资料，质量阈值设置依据。根据申报产品可检测的基因类型，申请人应确认软件工具的范围和所需的验证类型。并提供不同的计算方法研究资料。申请人应说明分析流程使用的软件类型。FASTQ 文件生成过程。明确去重质控参数，如每个碱基测序质量质控参数，序列内容，GC 含量以及序列长度分布，未匹配索引的相比对比例。

明确测序读数的基准质量得分（例如 Q 得分）的阈值。

明确修剪碱基百分比的阈值（如适用）。如采用其他方法，应提供研究资料及选择依据。

1.4.3 基因组对比以及 BAM 生成

申请人应提供适用于检测的过滤规则，明确过滤阈值及过滤目的和方式。例如，覆盖深度（DP）、突变序列数量（AD）频数均一化覆盖深度和变异频率（VF）、假的接头序列、去除 PCR 重复片段、消除低等位基因频率的变体、使用数据库来帮助注释和过滤的难以检测序列区域、验证特定的检测群体是否包含在数据集中，并记录数据库版本号。

申请人应提供参考序列的选择依据，本指导原则不适用于从头测序法，如为特殊序列，应提供采用该序列的依据并明确适用测序平台的关键序列信息。比对的序列被写入序列比对图（SAM）文件，接着转换成二进制比对图（BAM）格式。

1.4.4 突变基因分析：分析流程识别不同突变类型，通过过滤去除低质量测序数据。

1.4.5 突变注释：申请人应提供每个突变预测的功能性作用以及临床解释注释的形成过程及数据来源依据。

1.5 NGS 数据的存储、传输与共享

用于储存原始和经过分析后的检测结果。建议申请人提交数据存储中心的安全性、稳定性、维护与升级方案以及异

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/608044036101006055>