

附件 3

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) 注册技术审查指导原则

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, 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、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

人表皮生长因子受体 2 (Human Epidermal growth factor Receptor 2, HER2) 基因定位于染色体 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 蛋白主要通过与其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。HER2 基因的扩增和蛋白的过表达均可称为 HER2 阳性，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）等患者中。

对于浸润性乳腺癌适应症，HER2 阳性是指免疫组织化学（Immunohistochemistry, IHC）检测结果为（3+），或原位杂交方法（In situ Hybridization, ISH）检测结果为基因扩增。而 IHC 检测结果为（2+）的病例为不确定，需进一步应用原位杂交方法进行 HER2 扩增状态的检测。对于胃癌适应症，HER2 阳性是指 IHC 检测结果为 HER2（2+）的同时 ISH 检测结果为基因扩增，或 IHC 检测结果为 HER2（3+）。

对 HER2 阳性的乳腺癌和胃癌患者进行联合抗 HER2 靶向治疗（如抗 HER2 单克隆抗体、小分子酪氨酸激酶抑制剂等）使得部分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/或预后判断至关重要。对于浸润性乳腺癌适应症，HER2 是患者重要的预后指标，也是抗 HER2 药物治疗的主要预测指标。对于胃癌适应症，HER2 是晚期胃癌的疗效预测标志物。

本指导原则适用于采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 基因平均拷贝数（单信号）、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）。对于其他应用亮视野原位杂交法检测 HER2 基因扩增水平的方法，如显色原位杂交法（Chromogenic In Situ Hybridization, CISH）和银增强原位杂交法（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资料，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。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

综述资料的撰写应符合《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）（以下简称 2014 年第 44 号公告）的相关要求。内容主要包括产品预期用途、产品描述、有关生物安全性的说明、有关产品主要研究结果的总结和评价以及同类产品在国内、外批准上市的情况介绍等内容。重点内容要求如下：

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。

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标记的荧光染料，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IHC、其他原位杂交方法等）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：根据不同用途，分为基因特异性探针（HER2）和着丝粒探针（CEP17）两种类型。探针可选择细菌人工染色体（BAC）克隆或者聚合酶链反应（Polymerase Chain Reaction, PCR）等方法进行制备。下述内容是对于探针制备通用要求的举例，如有其他替代方法，应详细阐述其科学合理性。

1.1 基因特异性探针

1.1.1 探针序列的确定：包括探针所在基因的位置区域，人类基因组文库的筛选、比对和特征确认过程。

1.1.2 人类基因组文库克隆的鉴定：一般检测与基因区域相关的序列标记位点（STS）的存在情况，包括引物的设计，PCR过程和产物的电泳图谱。

1.1.3 探针的标记：一般为酶促反应或者化学合成方法，应详述标记方式的选择、反应体系和过程、产物的纯化方式等。

1.2 着丝粒探针：包括微卫星重复单元的序列，PCR 引物的设计和选择，荧光染料标记的反应体系、过程和产物的纯化方式等。

1.3 探针的质量控制：性能指标一般包括浓度、纯度、 T_m 值（如适用）、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、琼脂糖凝胶电泳、染色体分散良好的中期相分裂细胞杂交验证等方式。

2. 荧光染料：技术指标包括最大发射/吸收峰，与目的核酸片段的结合能力，持续被激发光源照射时的抗淬灭能力等。

3. 杂交缓冲液：应描述组成配方，说明各成分的作用。质量标准应包括 pH 值、盐离子浓度、甲酰胺浓度、硫酸葡聚糖浓度等。

4. 人 Cot-1 DNA（如适用）：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。应评价人 Cot-1 DNA 对样本检测背景信号的封闭效果，方法可选择通过观察背景强度以及非特异杂交的强度而确定人 Cot-1 DNA 的用量。如有其他清除背景信号的方法，应充分说明其科学合理性。

5. 二脒基苯基吲哚（DAPI）复染剂：评价指标包括对细胞核的染色能力以及抗淬灭能力等。

6. 企业参考品：应包含阴性参考品、阳性参考品和特异性参考品，并详细说明参考品的来源、组成、制备和保存情况。阳性参考品可选择经已上市产品确认 HER2 基因扩增的乳腺浸润癌/胃癌

组织，或者人乳腺癌/胃癌细胞株。阴性参考品可选择经已上市产品确认 **HER2** 基因无扩增的肿瘤组织，或者肿瘤细胞株。特异性参考品可选择健康人外周血培养细胞，应含有较多染色体分散良好的中期分裂相淋巴细胞。

7.质控片（如有）：可作为试剂盒的组分或者单独配置，包含阴性质控片、临界值质控片和/或阳性质控片。可选择临床组织样本或者 **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。

申请人应建立适当的反应体系，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，其中样本预处理过程一般包括样本脱蜡、样本预处理、蛋白酶处理三个环节，杂交检测过程一般包括变性、杂交、杂交后洗涤、**DAPI** 复染四个环节。另外，应合理控制样本的质量并明确要求。

1.样本的采集、固定、制片、保存和运输：应对采样部位及方法、样本中肿瘤组织的含量、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，应对切片厚度进行研究或者验证，要求计数区域的细胞核边界完整、**DAPI** 染色均一、细胞核无重叠、荧光信号清晰。不同类型的样本应分别验证。具体可参考国际或国内相关标准操作规程；如与标准操作规程有差异，应进行充分研究。

2.样本预处理：应对脱蜡条件、预处理温度及时间、特定盐

溶液的离子强度、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。如其中预处理过程可选择多个温度/时间的组合，蛋白酶消化过程可选择多个持续时间进行研究。温度/时间的组合是指首先在同一时期的几个不同温度下进行，然后在优化温度条件下的几个不同持续时间进行。

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。如选择多个温度/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。如选择多个温度/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。如选择多个缓冲液浓度以及多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。需提交在产品研制和成品验证阶段对试剂盒进行的所有性能评价的研究资料，包括方案设计、研究方法、材料和设备、验收标准、试验数据（包括代表性彩色图片）和结果统计分析等详细资料。建议着重对以下性能指标进行研究：

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中具有代表性的类型进行评估。方法可选择 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良性疾病组织样本；对同样数量的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 HER2 基因荧光信号数量，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。

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、染色体区段染色、反向 DAPI 条带等技术；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

准确性。应使用临床应用环境中所有可能的样本类型中具有代表性的组织类型进行评价，并提供样本来源、唯一可溯源编号、病理组织类型，以及明确的 **HER2** 基因扩增状态。对于适应症为乳腺癌的情况，用于评价的样本类型应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，良性疾病（如腺病及纤维腺瘤）以及正常乳腺组织等。对于适应症为胃癌的情况，用于评价的样本类型应包括肠型、弥漫型、混合型（**Lauren** 分型）胃癌，良性疾病（如胃粘膜慢性炎症）以及正常胃组织等。每种组织类型设置 2 至 3 例样本进行评价。建议着重评价申报产品对 IHC 检测结果为 **HER2**（2+）样本的 **HER2** 基因扩增状态的检测能力。

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、检测次数对结果判读的影响；对可能导致检测之间差异的主要变量进行验证。用于精密度评价的参考品应选择 **HER2** 扩增、**HER2** 无扩增以及临界值的连续切片组织样本。其中临界值样本和成簇扩增的样本应分别设置验收标准（标准差以及变异系数的范围）。建议参考下述方法进行各个指标的评价：

4.1 批内精密度：由同一操作人员使用同一批次产品进行检测，每例样本重复检测多次，对结果判读的一致性进行统计分析。

4.2 批间精密度：由同一操作人员使用多个批次产品进行检测，每例样本重复检测多次，对结果判读的一致性进行分析统计。

4.3 日间精密度：在多个不同日期，由同一操作人员使用同

一批次产品进行检测，对结果判读的一致性进行统计分析。

4.4 人员间精密度：由数位操作人员使用同一批次产品进行检测，每份样本由数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统计。

4.5 室间精密度：建议申请人选择不同的实验室进行检测间一致性的评价。

(五) 阳性判断值确定资料

HER2 检测结果的判读标准不断进行着更新，申请人应参考最新版临床指南性文件建立阳性判断值。应提交申报产品判读规则以及预设阳性判断值所依据的文献资料，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。应包含 HER2 扩增、HER2 无扩增以及一定数量的临界值（阳性判断值附近）组织样本，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。

首先设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/变异系数范围验收标准，确定初始统计细胞区域和数量，并在结果不确定时纳入更多区域或数量进行统计。

然后建议参照组织病理学特征或者 IHC 结果确定可能存在扩增的浸润性乳腺癌/胃癌区域，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 2 个区域中的至少 20 个细胞，并对结果进行统计分析。

（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，不同的光照条件对荧光标记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、特异性以及荧光信号强度。

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采集、处理、运输、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，评价指标应至少包括储存温度及时间。

（七）临床评价资料

临床试验总体要求及临床试验资料的内容应符合《办法》、2014年第44号公告和《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的规定，以下仅结合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）的具体特点对其临床试验中应重点关注的内容进行阐述。

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）已备案的医疗器械临床试验机构，按照有关规定开展临床试验。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. 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，需强调组织标本的标准采样、及时在 10%中性缓冲福尔马林溶液中充分固定及其他标准操作程序。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。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。

2.3 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。

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

应选择已批准上市，且已经充分联合药物进行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

用于胃癌等其他用途的此类检测试剂，如无已上市同类产品，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进行临床评价。

3.3 对于预期用途中已明确配合具体治疗药物名称的检测试剂，应采用联合药物评价临床试验的形式，同时评价检测结果与接受靶向治疗药物后疗效的相关性和试验用体外诊断试剂检测的准确性。

3.4 临床试验用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的石蜡包埋组织样本或组织芯片。

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 检测结果为 HER2 (2+) 的样本例数。但总样本例数不低于 1000 例。其中 IHC 检测结果为 HER2 (2+) 的样本不少于 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 检测结果为 HER2 (2+) 的样本不少于 120 例。样本的选择应包含临床预期使用人群和特异性样本，注意包含临床相关的各种病理组织类型。

对于适应症为浸润性乳腺癌的情况，样本应包含临床常见的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。

对于适应症为胃癌的情况，样本应包含临床常见的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。

4.1.1 对于本类试剂，常以配对列联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 检测结果为 HER2(2+) 样本的阳性符合率、阴性符合率和总符合率。应选择合适的统计学检验或推断方法（如 95% 置信区间），给出不确定样本占全部样本的比例，并评价其对符合率的影响，以检验两种试剂检测结果的一致性。

4.1.2 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、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。可采用试验用体外诊断试剂（考核试剂）与对比试剂或参考方法检测结果的肿瘤细胞 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，评价考核试剂与对比试剂对于肿瘤细胞 HER2 基因平均拷贝数和肿瘤细胞 CEP17 平均拷贝数（双探针适用）检测结果的一致性。

4.2 对临床试验中人群基本特征进行分析，包括：年龄、性别、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	类别	所占总数比例	考核试剂阳性例数	对比试剂阳性例数
性别	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联合药物评价临床试验部分

可采用前瞻性或回顾性研究方法，结合接受药物治疗后的临床试验数据等，分析检测结果。此部分研究通常使用Kaplan Meier曲线等生存数据分析方法，选取适当的统计方法检验客观有效率，评价检测结果与用药后临床结局之间的相关性。样本数量应符合统计学要求。

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试验人员间、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，各临床试验机构应统一操作方法，进行判读一致性训练及统一的质量控制，确保同样的样本在不同机构之间的判读结果保持一致。注意应包含IHC以及FISH检测结果为阴性、阳性和不确定的样本。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、标本的采集部位、标本类型、病理诊断结果（包含分级）、HE染色结果、免疫组织化学检测结果、考核试剂检测结果、对比试剂检测结果、第三方复核结果。所有采用原位杂交法的检测结果均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、差异结果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联合药物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（如适用）。

8.4 讨论和结论

对整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

申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下，根据产品研制、临床评价等结果，依据国家标准、行业标准及相关文献，编写产品技术要求。需符合《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）的要求。

产品性能指标主要包括：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，需符合相关编写规范的要求。

（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、临床医生针对检测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，以下详细说明书的重点内容，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。用于指导乳腺原发性浸润癌和/或胃及胃食管结合部腺癌的药物治疗和/或预后评估（预后评估仅乳腺癌适用）。

1.2 明确目标人群：例如对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）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）进行检测。因肿瘤个体化诊疗研究和发展不断深入，该目标人群可能随着个体化治疗药物和试剂的研究和发展而发生变化，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。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+）的情况下需进一步应用原位杂交方法确定HER2基因的扩增状态。

1.5 如未进行联合药物评价临床试验，则不应体现具体药物产品（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。

2. 【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，探针长度、序列设计、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）的组织或细胞株名称。

3.2 对检测中使用的探针信息进行简单介绍。

3.3 试剂盒中不包含但对该项检测必需的组分，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 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应分别描述。

6.2 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 详细说明质量控制情况：

建议实验室每次检测设置内对照和外对照（质控片），以对整个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。

7.5.1 内对照可为癌旁正常组织，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。”

7.5.2 外对照可选择已知 **HER2** 基因扩增状态的组织切片或者细胞株，至少包括临界值以及无扩增样本。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。分析质控结果不符合要求的原因并详述处理方式。

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）。

7.6 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。

8. 【阳性判断值】

根据相关指南及规范性文件，以 **HER2** 拷贝数平均值/细胞和/或 **HER2** 总拷贝数与 **CEP17** 总拷贝数的比值（双信号）的形式明确阳性判断值。

9. 【检验结果的解释】

9.1 从细胞核形态、探针信号强度、背景情况等多方面，详述杂交后样本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。

9.2 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；明确细胞计数的具体方法，包括每个样本初始读取细胞数及结果不确定样本的处理方法。明确 HER2 扩增异质性的处理方法。

可以列表的形式详述信号计数与阴阳性判定规则，应配合清晰彩图图例。例如对于浸润性乳腺癌，描述为“找到至少 2 个浸润癌区域，随机计数至少 20 个浸润癌细胞核中的双色信号，计算信号比值（比值=计数细胞核中红色信号总数/计数细胞核中绿色信号总数），根据以下标准对样本进行 HER2 基因扩增阴阳性的判断：比值 ≥ 2.0 ，或者比值 < 2.0 且平均 HER2 拷贝数/CEP17 拷贝数 ≥ 6.0 时为阳性；扩增细胞应均质、连续，且占浸润癌的 10% 以上。比值 < 2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 < 4.0 时为阴性。HER2/CEP17 比值 < 2.0 且平均 HER2 拷贝数/细胞 < 6.0 ，但 ≥ 4.0 时为不确定。对于不确定的样本，需再计算 20 个细胞核中的信号，或由另一阅片人重新计数。”

10. 【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。

10.1 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他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。

10.2 肿瘤组织 HER2 基因表达的异质性可能影响检测结果。例如可导致 IHC 与 ISH 检测、原发灶与转移灶、活检标本与手术切除标本的检测结果不一致。异质性在胃癌中更常见。对于胃镜活检标本，多点活检有助于减少肿瘤异质性的影响，提高检测的准确性。另外，新辅助治疗会影响胃癌 HER2 状态，治疗前活检标本和治疗后手术标本的综合判断有助于更好的用药指导。

10.3 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导致结果不准确等局限性。

10.4 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。

10.5 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。

10.6 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），不得用于其他样本类型或流式细胞检测等其他用途。

11. 【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，包括研究方法和评估结果：

11.1 灵敏度：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良性疾病组织样本中探针与目标基因位点的结合效率。

11.2 特异性：HER2 和 CEP17 探针对目标序列识别的特异性。

11.3 阴、阳性符合率：在不同组织类型中 HER2 基因的检出能力和准确性。

11.4 精密度：批内、批间精密度及不同时间、地点、检测系统（如适用）、人员之间的精密度。

11.5 临床试验数据总结。

12. 【注意事项】

12.1 有关试剂盒内人源组分（如有）生物安全性的警告。

12.2 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防护及危险物品的处理方法等。

12.3 荧光染料在光照条件下容易淬灭。为降低该影响，对所有含荧光探针的溶液，包括杂交后样本载玻片均应尽量避免或者减少在光照条件下保存和处理。

12.4 使用校准过的温度计测定溶液、水浴槽和温箱温度。

三、编写单位

国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心。