附件3

微卫星不稳定性（MSI）检测试剂临床评价

注册审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对微卫星不稳定性（MSI）检测试剂临床评价资料的准备及撰写，同时也为技术审评部门提供参考。

本指导原则是对微卫星不稳定性（MSI）检测试剂临床评价的一般要求，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。

本指导原则是供注册申请人和技术审查人员的指导性文件，但不包括审评审批所涉及的行政事项，亦不作为法规强制执行，应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则。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。

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，相关内容也将适时进行调整。

一、适用范围

本指导原则适用于采用荧光PCR-毛细管电泳法检测结直肠癌患者肿瘤组织细胞基因组DNA中的MSI状态，从而辅助鉴别结直肠癌中可能的林奇综合征患者的体外诊断试剂。

对于采用其他检测技术进行MSI检测的产品，申请人可以根据产品特性考虑本指导原则的适用性，对不适用部分采用其他适当的评价方法，但需阐述不适用的理由，并验证替代方法的科学合理性。特别是采用NGS方法检测MSI时，在检测位点、判读方法等方面均与毛细管电泳法有显著差异，应从检验原理的特点出发，设计科学的评价方法对产品临床性能进行综合评价。如申请其他预期用途，例如免疫治疗药物的伴随诊断，申请人应针对该预期用途提供充分的临床性能评价资料。

本指导原则适用于进行体外诊断试剂产品注册申请和变更注册申请的产品，重点针对临床评价资料的准备及撰写明确要求。

有关此类产品的背景信息以及本指导原则适用范围确定的依据参见附件。

二、注册审查要点

（一）临床评价资料

1.临床评价路径和基本要求

该类试剂应通过临床试验路径进行临床评价，临床试验的开展应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》《医疗器械临床试验质量管理规范》以及《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的相关要求，如相关法规、规章、规范性文件有更新，临床试验应符合更新后的要求。

2.临床试验开展应具备的基础

临床试验开展应建立在充分的临床前研究基础之上，包括科学的产品设计、充分的分析性能研究、阳性判断值研究等。

采用荧光PCR-毛细管电泳法进行MSI DNA检测，一般对肿瘤组织与正常对照样本分别进行相应微卫星位点检测，将两者检测峰图进行比较，确定肿瘤组织中是否发生了微卫星序列长度的变化（按照一定的阳性判断值判定），同时通过设定适当的判定标准（发生序列长度变化的微卫星位点数量）确定肿瘤组织的MSI 状态（MSI-H、MSI-L/MSS）。MSI检测的灵敏度和特异度与位点选择、反应体系的确定、微卫星序列长度变化判定标准以及MSI-H判定标准等产品设计因素直接相关，产品设计开发中应进行充分的验证。同时，为了保证检测准确性和可重复性，应针对样本质量提出明确要求，例如组织样本中肿瘤细胞比例，核酸提取纯度和浓度等。

2.1微卫星位点选择

MSI检测试剂在产品设计中最关键的问题之一在于微卫星位点的选择。

1997年Bethesda指南中推荐的是一个简称为“2B3D”的微卫星位点组合（NCI panel），由 2个单核苷酸位点（*BAT-25*和*BAT-26*）和3个双核苷酸位点（*D2S123*、*D5S346*和*D17S250*）组成。同时，该指南中也推荐了针对这一组合的判定标准：即5个微卫星位点中2个或2个以上发生序列长度变化时，判定为MSI-H，1个发生序列长度变化时，判定为MSI-L，若5个微卫星位点均没有发生序列长度变化，则为微卫星稳定MSS。

2002年，NCI举办的第二次HNPCC研讨会上对MSI的检测进行了修订和补充，推荐了由5个单核苷酸微卫星位点构成的组合（Pentaplex Panel），经过后续修订，形成了包括*BAT-25*、*BAT-26*、*NR-21*、*NR-24*、*NR-27*在内的5个单核苷酸微卫星位点组合。

目前临床上还有*BAT-25*、*BAT-26*、*NR-21*、*NR-24*和*MONO-27*五个单核苷酸位点组合。

综上，多项研究对MSI检测提出了不同的微卫星位点组合，以单核苷酸微卫星位点为主，一般包括5个位点，各个组合之间略有交叉和互补。

在MSI检测试剂的设计过程中，申请人可依据相关文献资料，结合自身的前期研究数据，综合考虑备选位点在MSI-H患者中的阳性率、微卫星序列长度变化易读性等因素，选择适当的位点组合，并设定合理的判定标准，从而对MSI-H实现灵敏和特异的检测。申请人应特别关注针对中国人群的研究数据，位点组合应适合中国人群特点，满足中国人群的临床诊断需要。

最终临床试验数据应能够证明该组合对于结直肠癌中LS患者辅助筛选具有较高的临床灵敏度和良好的临床特异度。申报资料中，申请人应详述位点组合的选择依据，提供相关文献和数据。

2.2结果判读

每个微卫星位点毛细管电泳峰图的解读、微卫星序列长度变化的判定标准以及MSI-H和MSI-L/MSS的判定标准是直接影响到产品临床性能的关键要素，申请人应根据充分的临床前研究数据，同时参考科研论文和文献进行科学的设定，并在说明书中详细说明。特别是对于一些可能出现的不易判读的峰形，可在说明书中结合具体的图示和举例进行相应的说明。临床试验过程中严格按照说明书的要求进行操作和判读。

3.临床试验设计和实施的要求

临床试验应选择不少于3家（含3家）符合要求的临床试验机构开展。临床试验入组人群应为结直肠癌患者，样本量应满足统计学要求。

临床试验应按照说明书要求采集样本、评价样本质量、完成样本处理、检测和结果解读。试验中按要求进行相应的设盲操作，试验全过程注意避免引入偏倚。临床试验产生的所有信息应进行详实的记录。

临床性能评价应至少包括以下三方面研究：

3.1肿瘤组织细胞基因组MSI状态（MSI-H、MSI-L/MSS）判定的性能研究

3.1.1如果申报产品采用的微卫星位点组合已经得到临床广泛认可，则可以选择如下任一种方法进行此部分临床性能研究。

方法一：采用试验体外诊断试剂与MMR蛋白IHC检测进行比较研究，评价两种检测结果的一致性。

作为对比方法的MMR蛋白IHC检测应采用已获准上市、经临床实践认为性能良好的检测试剂盒，并在临床试验质量管理下完成检测。IHC检测的MMR蛋白主要包括MLH1、MSH2、MSH6和PMS2，四种蛋白均为阳性表达，则为pMMR，任一MMR蛋白缺失即为dMMR。检测过程中，样本处理和结果解读应符合相关操作规范和判读标准的要求，试验全过程做好质量控制。检测结果应由有经验的病理医生进行判读，并经双人复核。为避免机构之间差异，试验开始前应统一操作和判读标准，并进行适当的机构间一致性评价。临床试验报告中应总结IHC检测过程中的质控数据和结果。临床试验数据表中列出所有病理医生的判读结果和最终的结果解释。

入组病例中dMMR和pMMR病例例数应分别满足统计学要求，试验设计时可采用目标值法公式对最低样本量进行估算。

比较研究的试验结果采用四格表方式进行总结，计算阳性/阴性符合率和总符合率及其95%置信区间。对于两种方法检测结果不一致的样本，可结合患者LS相关基因胚系突变检测及其他临床诊断信息进行复核，也可以采用其他适当的方法对差异原因进行分析。

评价指标：与MMR蛋白IHC检测的阳性符合率、阴性符合率95%置信区间下限一般分别不低于90%和95%。

方法二：采用试验体外诊断试剂与已上市同类产品进行对比试验，评价两种试剂判定MSI-H和MSI-L/MSS的一致性。其中MSI-H和MSI-L/MSS样本例数应分别满足统计学要求，试验设计时可采用目标值法公式对最低样本量进行估算。两种试剂判定MSI-H和MSI-L/MSS的阳性符合率、阴性符合率95%置信区间下限一般不低于95%。

3.1.2如果申报产品采用全新的微卫星位点组合（包括全新的MSI-H判定标准），该组合在以往国内、外权威指南、规范等文件中均未有推荐，且尚未受到行业广泛认可，则应首选上述方法一进行临床性能评价，如有必要，申请人可同时结合方法二对产品临床性能进行更加全面的评价，证明申报产品对于MSI-H和MSI-L/MSS判定的性能能够满足临床需求。

3.2每个微卫星位点检测性能研究

采用试验体外诊断试剂与Sanger测序法或检测相同微卫星位点的已上市同类产品进行对比试验，评价试验体外诊断试剂与对比方法检测每个微卫星位点的一致性。

临床试验前可采用适当的方法对每种微卫星位点预期阳性（即有序列长度变化）例数和阴性（即无序列长度变化）例数进行最低样本量估算，保证样本量满足统计学要求。

针对每个微卫星位点的检测结果分别采用四格表方式进行总结，计算阳性/阴性符合率和总符合率及其95%置信区间。对于两种方法检测结果不一致的样本，可采用合理的方法进行复核，并逐一列出试验体外诊断试剂、对比方法以及复核方法的检测结果，如毛细管电泳图、Sanger测序序列图等，对差异原因进行详细分析。对于Sanger测序法，受到方法学限制，可能不能准确读出核苷酸重复个数，但通过正常对照样本和肿瘤组织样本的测序图谱对比应能够准确判定是否存在序列长度变化。

申请人应详述Sanger测序方法的建立、验证过程，特别是测序引物设计、测序靶序列选择（包括与试验体外诊断试剂扩增序列对比）、反应体系验证、测序结果判读以及该测序方法的最低检测限等性能验证数据，举例说明测序图谱的判读方法，必要时标示出串联重复序列的位置。应详述判读方法设定的依据。

评价指标：每个微卫星位点检测阳性、阴性符合率95%置信区间下限一般不低于90%。

3.3 MSI检测辅助鉴别结直肠癌中可能的LS患者的临床性能研究

采用试验体外诊断试剂与结直肠癌中LS诊断的临床参考标准，即LS相关基因（主要为*MLH1、MSH2、MSH6、PMS2*，少部分为*EPCAM*）胚系突变检测结果进行比较研究，评价产品临床性能。胚系突变检测可能涉及到NGS和MLPA(Multiplex Ligation- dependent Probe Amplification，多重连接探针扩增技术)（针对大片段缺失和插入）等方法；胚系突变的结果应依据国际上公认的指南和数据库等进行判定。临床试验资料中应针对胚系突变检测方法的建立和性能评价数据等进行详细描述，并明确结果判定的依据。

入组病例应包括LS相关基因胚系突变阳性（包括致病性突变和可能致病性突变）和阴性病例。为了避免受试人群的选择偏倚，建议针对符合入组标准的结直肠癌患者进行顺序入组，如其中LS相关基因胚系突变阳性病例较少，可以采用适当的方式进行富集。应注意：富集入组的LS相关基因胚系突变阳性病例应不是依据MSI检测进行筛选、并最终确诊的患者，或者所依据的MSI检测微卫星位点组合应与试验体外诊断试剂不同。

样本量可采用如下公式进行估算：



公式中*n*为样本量，*Z1-α/2*为置信度标准正态分布的分位数，*P*为评价指标预期值，*Δ*为*P*的允许误差大小。

例如，根据已有文献和数据，灵敏度预期值设为95%，特异度预期值设为85%，允许误差*Δ*取值0.05。则阳性组最低样本量为73例，阴性组最低样本量195例。

为保证临床性能评价的充分性，临床试验样本量建议不低于上述估算样本量，同时充分考虑可能的脱落率和临床性能评价的需要，设定入组样本量要求。

试验结果采用四格表方式进行总结，计算试验体外诊断试剂的临床灵敏度和特异度及其95%置信区间。应针对总样本、顺序入组样本和富集入组样本试验结果分别进行统计分析，其中顺序入组样本中，按照相关流行病学规律，应有一定数量LS相关基因胚系突变阳性样本。

对于假阴性和假阳性结果，应充分结合临床诊断的其他信息（例如基因胚系突变的具体情况、体细胞基因突变情况等）进行解释和分析。

4.临床试验方案、小结和报告

各临床试验机构应采用同一方案，并在整个临床试验过程中严格执行，不可随意改动。方案中对试验设计类型、对比方法选择、受试者选择、评价指标、统计分析方法、样本量估算和质量控制要求等做出明确的规定，并根据各临床试验机构情况合理确定样本量分配计划。各临床试验机构选用的对比方法应保持一致，以便进行合理的统计学分析。

各临床试验机构应对临床试验数据和实施情况进行总结，出具临床试验小结。

临床试验报告应对整体临床试验实施过程、结果分析、试验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。

（二）产品说明书

根据前文所述本指导原则适用产品的预期用途限定，产品说明书中【预期用途】项下建议描述为：本产品用于体外定性检测结直肠癌患者肿瘤组织FFPE样本基因组DNA中的微卫星位点……（列出待测微卫星位点名称），通过与正常对照样本检测结果对比，确定是否发生了微卫星序列长度变化。根据发生序列长度变化的微卫星位点数量，将结直肠癌分为微卫星高度不稳定（MSI-H）、微卫星低度不稳定（MSI-L）以及微卫星稳定（MSS）三种微卫星状态。检测结果用于辅助鉴别结直肠癌中可能的林奇综合征患者。

同时应注明：此类产品的应用应参考临床相关诊疗指南的要求，检测结果的解读应结合其他临床诊断信息、疾病家族史及实验室检测信息进行综合分析。

如未进行用药指导相关的临床试验，还应在说明书中注明：该产品尚未进行有关用药指导的临床性能评价。

三、参考文献

[1]体外诊断试剂注册与备案管理办法[Z].

[2]医疗器械临床试验质量管理规范[Z].

[3]体外诊断试剂临床试验技术指导原则[Z].

[4]NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology: Colon Cancer. Version 2.2021.

[5]Genetic/Familial High-Risk Assessment: Colorectal Version 1.2021, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology.

[6]Sepulveda A R , Hamilton S R , Allegra C J , et al. Molecular Biomarkers for the Evaluation of Colorectal Cancer[J]. Journal of Molecular Diagnostics, 2017, 19(2):187-225.

[7]Asad U , Richard B C , Terdiman J P , et al. Revised Bethesda Guidelines for Hereditary Nonpolyposis Colorectal Cancer (Lynch Syndrome) and Microsatellite Instability[J]. Journal of the National Cancer Institute, 2004(4):936.

[8]中国临床肿瘤学会（CSCO）结直肠癌诊疗指南2021[M].人民卫生出版社,2019.

[9]中国临床肿瘤学会结直肠癌专家委员会,中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组,中国医师协会结直肠肿瘤专业委员会遗传专委会.结直肠癌及其他相关实体瘤微卫星不稳定性检测中国专家共识[J].中华肿瘤杂志,2019,41(10):734-741.

[10]中国抗癌协会大肠癌专业委员会遗传学组.遗传性结直肠癌临床诊治和家系管理中国专家共识[J].实用肿瘤杂志,2018,33(1):3-16.

[11]中国临床肿瘤学会（CSCO）结直肠癌专家委员会.结直肠癌分子标志物临床检测中国专家共识[J].中华胃肠外科杂志,2021,24(3):191-197.

[12]Lin Dong, Xianglan Jin, Wenmiao Wang, Qiurong Ye, Weihua Li, Susheng Shi, Lei Guo, Jianming Ying, Shuangmei Zou. Distinct clinical phenotype and genetic testing strategy for Lynch syndrome in China based on a large colorectal cancer cohort[J]. International journal of cancer, 2020, 146(11):3077-3086.

附件

关于微卫星不稳定性（MSI）检测试剂

的背景介绍

一、微卫星与微卫星不稳定性

微卫星（microsatellite，MS）是指细胞基因组中以少数几个核苷酸（一般为1～6个，多为单碱基或双碱基）为单位串联重复的DNA序列，又称短串联重复（short tandem repeat，STR）。微卫星位点广泛存在于人类基因组中，约占基因组3%。

在正常状态下，微卫星的长度保持不变，并且稳定遗传；DNA错配修复（mismatch repair，MMR）功能出现异常时，微卫星出现的复制错误得不到纠正并不断累积，使得微卫星序列长度发生改变，称为微卫星不稳定性（microsatellite instability，MSI）。MSI根据程度可以被分成3类：微卫星高度不稳定（MSI-high，MSI-H）、微卫星低度不稳定（MSI-low，MSI-L）、微卫星稳定（microsatellite stability，MSS）。

MSI现象于1993年在结直肠癌中首次发现。随着研究深入，发现MSI现象不止存在于结直肠癌，在子宫内膜癌、胃癌、卵巢癌等实体瘤中均有发生。

二、MSI检测在结直肠癌中的临床意义

MSI是错配修复功能缺陷导致的结果。在临床实践中，错配修复功能状态可以通过MMR蛋白免疫组织化学法（immunohistochemistry, IHC）检测和MSI DNA检测来反映。IHC检测中错配修复蛋白均有表达即为错配修复功能完整（proficient mismatch repair，pMMR），任一错配修复蛋白缺失即为错配修复功能缺陷(deficient mismatch repair，dMMR)；MSI DNA检测中，MSI-H通常提示为dMMR，MSI-L或MSS通常提示为pMMR。大量数据显示，MMR蛋白IHC检测和MSI DNA检测结果一致性可以达到90%以上。

根据国内、外结直肠癌诊疗指南推荐，在结直肠癌病理学诊断过程中，应进行MMR蛋白IHC或MSI DNA检测，从而确认患者的错配修复状态。其临床意义有以下几方面。

（一）MSI检测用于结直肠癌预后评价和用药指导

根据美国国立综合癌症网络（National Comprehensive Cancer Network，NCCN）结肠癌、直肠癌临床实践指南及中国临床肿瘤学会（Chinese Society of Clinical Oncology，CSCO）结直肠癌诊疗指南，MSI可能是结直肠癌的预后因子，并与结直肠癌患者化疗或免疫治疗效果有关。有研究表明，dMMR/MSI-H的II期结直肠癌患者预后良好，且不会从单药氟尿嘧啶类药物的辅助化疗中获益。dMMR/MSI-H的晚期/转移性结直肠癌患者可能从免疫治疗（PD-1单抗）中获益。

（二）MSI检测用于辅助鉴别结直肠癌中可能的林奇综合征患者

林奇综合征（Lynch syndrome，LS）是一种常染色体显性遗传性肿瘤综合征，2010年之前又被称为遗传性非息肉病性结直肠癌( hereditary non-polyposis colorectal cancer，HNPCC)。LS是最常见的遗传性结直肠癌综合征，约占结直肠癌发生率的3%。LS患者结直肠及其他多部位罹患恶性肿瘤的风险显著升高，且平均发病年龄较轻。LS相关的致病基因主要包括MMR家族中的*MLH1、MSH2、MSH6*或*PMS2*基因*，*此外*EPCAM*基因胚系突变引起MSH2不表达也是导致LS的机理之一。由于MMR基因的功能失活性改变，LS患者往往表现为dMMR和(或)MSI-H表型。

以往依据阿姆斯特丹标准( Amsterdam criteria)和Bethesda 指南(Bethesda criteria guidelines)，结直肠癌中LS患者的识别和诊断主要依靠先证者的发病年龄、相关肿瘤家族史、组织病理学特征等，这种筛查策略的灵敏度较低。目前MMR蛋白IHC检测和（或）MSI DNA检测成为主流的LS筛查策略，CSCO结直肠癌诊疗指南推荐对于70岁以下（含70岁）结直肠癌患者均可进行MMR蛋白IHC检测和（或）MSI DNA检测以筛查可能的LS患者（二级推荐），dMMR/MSI-H 患者进行LS相关基因的胚系突变检测，以明确诊断。NCCN结肠癌、直肠癌临床实践指南等基于成本效益分析，认为可以对所有结直肠癌患者进行MMR蛋白IHC检测或MSI DNA检测，以筛查LS患者。

（三）指导原则适用范围的考虑

综合以上背景信息，MSI检测对于结直肠癌患者预后评价、用药指导和LS的辅助筛选有重要的临床意义。基于目前临床实践和体外诊断试剂审评经验，本指导原则适用的产品主要指预期用途限定为结直肠癌患者LS辅助筛选的诊断试剂，检测方法学主要针对荧光PCR-毛细管电泳法。

三、MMR蛋白IHC检测和MSI DNA检测的优势和局限

MMR蛋白IHC检测和MSI DNA检测在评价错配修复功能状态中各有优势和局限。

IHC检测的优势是操作简便，检测平台普及性高，并可以直接反映可能导致MSI-H发生的MMR缺陷基因，存在的问题是IHC影响因素较为复杂，常因样本前处理不规范和结果判读标准掌握不当导致结果不准确。此外，罕见的情况下，MMR基因的错义突变可能导致MMR蛋白的氨基酸序列发生改变，蛋白功能障碍，但抗原性完整，表现为MMR功能缺陷但IHC染色仍呈现正常表达的“假阴性”结果。

MSI的DNA检测更易标准化，可以实现较好的重复性。但只能选择若干确定的微卫星位点进行检测，有可能由于位点代表性问题造成“假阴性”，且检测条件要求较高、常需要配对受试者的正常对照样本。组织样本中肿瘤细胞比例低、肿瘤组织异质性等问题可能会影响检测质量，造成“假阴性”结果。此外，有研究表明，某些*MSH6*胚系突变发生时PCR检测可能表现为MSS，从而造成MSI检测针对LS的假阴性结果。

NCCN结直肠癌遗传高风险评估指南中指出，对于LS患者，IHC和MSI检测分别有5～10%的假阴性。