

附件

## 人类白细胞抗原（HLA）基因分型 检测试剂注册审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人（以下简称“申请人”）对人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）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提供参考。

本指导原则是对 HLA 基因分型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。同时本指导原则仅针对 HLA 基因分型产品注册申报资料中的个性化要求进行撰写，其他通用要求和未尽事宜应当符合相关法规和指导原则要求。

本指导原则为注册申请人和技术审评人员使用的指导性文件，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，但是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，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

本指导原则适用于基于核酸检测技术定性检测人静脉全血

样本中 HLA 基因以进行 HLA 基因分型的试剂，用于造血干细胞移植或实体器官移植的配型检测。

本指导原则适用的核酸检测技术包括聚合酶链反应-序列特异性寡核苷酸杂交（polymerase chain reaction-sequence specific oligonucleotide, PCR-SSO）方法、荧光熔解曲线法、荧光 PCR 法和高通量测序法等。其临床预期用途如下：

1.用于低/中分辨率分型，为肝/肾等实体器官移植供受者的选择提供参考。

2.用于高分辨率分型，为造血干细胞移植配型或肝/肾等实体器官移植供受者的选择提供参考。

此处的低/中分辨率与《人类白细胞抗原基因分型方法分辨水平的专家共识》中的低分辨率和中分辨率定义一致，高分辨率包括共识中的高分辨率和部分超高分辨率（可完全确定第二个域数字），不包括可检测到第三个域的超高分辨率和第四个域的等位基因分辨率。

对于采用其他样本类型和其他方法学如直接测序法（sequence-based typing, SBT）、聚合酶链反应-序列特异性引物（polymerase chain reaction-sequence specific primer, PCR-SSP）方法的试剂，可能部分要求不完全适用或本文所述内容不够全面；申请人可参考本指导原则，同时依据产品特性对适用部分进行评价，对不适用部分阐述不适用的理由，并验证替代方法的科学合理性。需要时补充其他必要的评价内容。

## 二、注册审查要点

### （一）综述资料

综述资料主要包括产品概述、产品综述、预期用途、申报

产品上市历史及其他需说明的内容，具体可参考《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》（国家药品监督管理局公告 2021 年第 122 号）。

技术原理以图示结合文字的形式描述申报产品的目标靶区域、检验方法、结果判读和生信分析过程。此处的检验方法包括产品设计、检测孔位布局、所用方法学如高通量测序法的具体检测原理，包括扩增方式（桥式 PCR/DNB 滚环扩增/等温扩增等）、测序化学（包括荧光标记的位置、信号延伸的方式、双端测序的过程等）、检测方式（单色荧光/双色荧光/四色荧光/半导体/电信号）等。

另外，建议明确申报产品检测单个样本所需时间，每个检测周期最多可检测样本数量及检测所需时间（从全血样本处理开始至结果分析结束）。

产品包装描述部分，为便于理解申报产品设计、技术原理和结果判读方法，充分评估申报产品的使用风险，建议在产品描述部分提交申报产品外包装及试剂盒中各组分的实物图片。

与同类和/或前代产品的比较着重从预期用途、技术原理、检测基因座、检测分辨率（低分辨率/中分辨率/高分辨率）、主要组成成分、性能指标、检测所需时间、临床应用情况等方面详细说明申报产品与已获批准的同类/前代产品之间的主要区别。

预期用途应明确申报产品所能检测的 HLA 基因座及分辨率，具体的临床用途如造血干细胞移植、具体的组织器官移植。因为不同的组织器官移植考虑的基因分型不同，申报产品应当明确具体用于何种器官的移植，同时详细阐述申报产品所测基

因座和具体等位基因可支持预期用途声称的理论依据（包括诊疗指南、专家共识等），提供文献综述及各文献全文。

其他需说明的内容部分，概括描述整个检测系统的组成，提供配套申报产品使用的仪器、试剂和软件的注册信息，提供核酸提取试剂、通用测序试剂及其他如需提供的说明书。

## （二）非临床资料

### 1.产品技术要求及检验报告

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、前期评价等结果，依据相关文件资料，结合产品特性按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》和《体外诊断试剂主要原材料研究注册审查指导原则》的要求编写。

性能指标建议参考相关行标如《人类白细胞抗原（HLA）基因分型检测试剂盒》的要求，设置准确度、重复性、有效检测范围，其中重复性检验所用样本浓度应为上样要求的最低DNA浓度。

该产品作为第三类体外诊断试剂，应当以附录形式明确主要原材料以及生产工艺要求。同时，建议在技术要求附录中详细描述企业参考品的设置和制备过程，明确各企业参考品的样本类型、等位基因和DNA浓度。

提供三个不同生产批次产品的检验报告。目前已有适用的国家标准品发布，技术要求中应当体现国家标准品的相关要求。

### 2.分析性能研究

申请人应当提交在符合质量管理体系的环境下生产的试剂盒进行的所有分析性能评估资料，包括具体试验方案、试验数据、统计分析结果及结论等详细资料。申报资料中描述有关试

验的背景信息，包括试验地点，采用的试剂名称、规格和批号，仪器名称和型号，软件/数据库的名称和版本号，样本的背景信息（来源、样本编号、样本类型、采集及处理方式、等位基因和浓度确认方法及结果）等。分析性能评估用样本首选真实样本或其 DNA 提取液，其次为 IHIW（International HLA and Immunogenetics Workshop）参考盘和 UCLA 参考盘，如声称多个适用仪器，分别针对不同适用仪器进行性能评估研究。

分析性能评估的试验方法可以参考国际或国内有关体外诊断试剂性能评估的指导原则进行，对于本类产品建议着重对以下分析性能进行研究。

## 2.1 适用的样本类型

选择不影响核酸分子检测的抗凝剂，如 EDTA 和枸橼酸盐进行人静脉全血样本采集。鉴于肝素影响核酸扩增过程，不建议使用肝素抗凝。若适用多种抗凝剂，建议通过同源比对研究一定数量的临床样本验证各种抗凝剂的适用性。

## 2.2 准确度

目前该类产品检验步骤复杂，结果判读方式不仅依赖软件算法如单倍体拼接构建的算法，也部分依赖人工判读，且判读结果受人员影响。为尽可能减少人员的主观性影响和验证软件算法的准确性，准确度研究应当采用盲法进行。描述盲法操作要求及盲态保持情况，并提供编盲表。

准确度研究可选择与同类已上市同等分辨率或更高分辨率产品进行方法学比对，若无已上市同类产品，可选择目前广泛使用如中华骨髓库合作实验室使用的高分辨率检测方法/产品进行方法学比对；也可选择检测参考盘如 IHIW 参考盘、

UCLA 参考盘等进行一致性分析。研究所纳入样本包含检测范围内所有的中国人群常见等位基因 (**Common alleles**) (以下简称为 **Common** 等位基因) 和一部分的确认等位基因 (**Well-documented alleles**) (以下简称为 **WD** 等位基因), 具体等位基因参考现行版《中国常见及确认的 HLA 等位基因表 (CWD)》, 并建议纳入罕见等位基因 (**Rare alleles**) (以下简称为 **Rare** 等位基因)。另外, 考虑到杂合子样本的检出错误率高于纯合子, 准确度研究中应当纳入部分杂合子样本。同时准确度研究应当模拟真实使用情况, 每个样本仅检测一次, 不可重复检测。

一致性分析的接受标准为低分辨率产品的血清型 (等位基因的域) 与对比方法结果一致; 中分辨率产品的血清型 (等位基因的域) 与对比方法结果一致, 等位基因第二个域的检测结果组合中包含对比高分辨率方法的检测结果; 高分辨率产品与对比高分辨率方法的等位基因相同。对于不一致及模棱两可 (多种可能判定) 的结果, 应当结合其他检测方法的结果进行分析。

需要注意的是, 低/中分辨率产品的结果虽然只能确定等位基因的域, 但考虑到包容性, 准确度研究所用样本也应当纳入 CWD 表中所有的 **Common** 等位基因, 如 A3 血清型对应的 HLA-A\*03:01 和 HLA-A\*03:02。

### 2.3 精密度

精密度研究所用样本包括 CWD 表中所有的 **Common** 等位基因, 并包含一定数量的杂合子。浓度水平至少包括上样要求的最低 DNA 浓度。当有充足的样本时, 建议精密度研究所用

样本与准确度研究所用样本不同。同时，为验证配套判读软件的准确性和稳定性，尽可能减少人员操作和判读的主观性影响，精密度研究所用样本应当编盲，即在原始编号的基础上，对每次检测所用样本重新进行编号。编盲人员不可以作为检测人员，从而确保检测人员在每次进行精密度研究时，对样本的结果保持未知状态。描述盲法操作要求及盲态保持情况，并提供编盲表。

考虑到 HLA 基因分型检测试剂所用方法学如 SSO、溶解曲线法和高通量测序法的操作步骤较多，结果判读较为复杂，受人员操作熟练度和仪器的影响较大。因此，在精密度研究中，纳入不同熟练程度的操作人员、不同实验地点、不同实验仪器、不同试剂批次和检测时间等影响因素。

精密度研究包括重复性、中间精密度和再现性。考虑到申报产品的检测用时较长，检测所需样本较多，建议申请人在设计精密度研究方案时将重复性、中间精密度和再现性精密度研究进行组合研究。组合研究的总体研究时长不少于 20 天，至少在 3 个不同的实验室进行，每个实验室采用两名操作人员，不同实验室的操作人员不同且熟练程度不同，不同实验室所用仪器可为同一型号不同序列号或不同型号；整个研究至少包含 3 个试剂批次，每个试剂批次和每种适用仪器至少在不连续的 5 天中使用。重复性精密度试验可固定在其中一个实验室，由同一操作人员使用同一批次试剂在同一天进行。最终精密度研究中每个样本至少有  $15+X$  次（3 批试剂/个实验室\*不连续的 5 天+ $X$  次重复）检测结果。

研究结束后对每个样本的重复性精密度、批间差、中间精

密度和再现性精密度进行统计分析。每个样本的每次检测结果应当与目标结果一致，当产生不一致结果时，申请人应当查找不一致原因和影响因素，并提供解决方案。

对于低分辨率/中分辨率产品，若申报产品主要原材料研究资料部分显示设计的探针/引物与同一血清型不同等位基因序列结合的区域不存在碱基差异，如探针/引物与 HLA-A\*03:01 和 HLA-A\*03:02 的扩增靶区域结合时，结合序列无碱基差异，则表明探针/引物具有可覆盖性。此时，精密度研究中可选择两个等位基因的一种进行研究。若存在差异，则均纳入进行精密度研究。应当注意的是，此处的探针/引物，是最终参与结果判定扩增片段的探针/引物，而非前期富集靶序列等初步扩增用的探针/引物。

对于高分辨率的高通量测序法产品，建议在进行精密度研究时测序过程采用最大样本通量，评估最大样本通量检测和数据分析的稳定性。

## 2.4 分析特异性

### 2.4.1 干扰试验

可通过在全血样本中添加干扰物质的方式，评价添加前后干扰物质对靶基因提取和检测的影响。研究用样本应取每个基因座中具有代表性的等位基因，浓度水平包括上样 DNA 浓度范围下限。

针对可能的内源干扰物和外源干扰物包括血红蛋白、甘油三酯、胆红素、白蛋白和常见治疗用药物等进行干扰试验研究。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，应当确定不产生干扰的最高浓度。

## 2.4.2 交叉反应

对与靶基因序列相近或具有同源性、易引起交叉反应的其他 HLA 基因座的基因序列进行交叉反应研究。

## 2.5 核酸提取/纯化性能

考虑到分析性能研究时所使用的 DNA 提取液可能并非来自于说明书中配套使用的核酸提取/纯化试剂，因此，核酸提取/纯化性能研究不仅包括对核酸提取试剂本身性能的研究，还包括其与检测试剂配套使用时的功能性验证。若申报产品适配多个核酸提取试剂，应当分别进行验证。

采用全血真实样本进行提取核酸纯度、浓度、完整度、提取效率的研究。

核酸提取试剂配合检测试剂的准确度、精密度和抗干扰研究。每个基因座中选取有代表性的等位基因进行准确度验证、再现性精密度和抗干扰研究。再现性精密度研究包括不同批次的核酸提取试剂、不同操作人员和不同适用仪器和不同时间等影响因素。此部分功能性验证可单独进行，也可纳入各项性能研究中组合进行。

## 2.6 参与国内外室间质评的情况

目前国内外有多个室间质评项目，如我国卫生健康委临床检验中心的室间质评、中华骨髓库实验室室间质评、美国的 UCLA 室间质评等。建议申报产品参与室间质评项目，提交室间质评的结果。

## 3. 反应体系研究

### 3.1 样本要求

请详述全血样本的采集要求及处理方式，明确适用的抗凝

剂。

核酸提取过程的反应条件和反应体系研究，包括全血样本的用量、核酸提取方式、洗脱方式和洗脱体积等。依据研究结果明确核酸样本的质量接受标准，包括但不限于核酸浓度范围、纯度及完整性等。同时，当对样本质量不满足接受标准时，提出处理方案如重新取样或扩大样本量再进行核酸提取/纯化。

### 3.2 检测流程、反应体系研究和数据分析

详细描述检验方法的设定和优化过程，包括各步骤中反应程序和反应体系的设置和优化、数据分析的方法和各环节的质量控制指标和可接受标准。明确各步骤和分析过程所用试剂、仪器、软件和数据库的名称及版本号。

**DNA 浓度要求。**在保证检测灵敏度和准确度的前提下，考虑到靶标的特性和方法学的特点，此类产品大多要求 **DNA** 浓度在一定范围内。申请人在对产品研发设计时，需考虑申报产品检测所需的 **DNA** 浓度范围。同时考虑到 **HLA** 基因的高度多态性和引物探针的多样性，建议选择具有代表性的等位基因进行研究。

**3.2.1** 对于采用荧光 **PCR** 法和熔解曲线法的低/中分辨率产品，详细描述各反应步骤中样本和试剂的加样体积、酶浓度、引物/探针浓度、**dNTP** 浓度、阳离子浓度、**PCR** 扩增程序和熔解曲线分析程序等反应条件和质控体系设置等。

不同适用仪器的反应条件如果有差异应当分别详述，并提交验证资料。

此类方法通过多条特异性短序列组合表达的方式，定性判读基因型结果，大多需配合特定软件进行数据分析和结果判读。

因此，此处应当详细描述配套使用数据分析和判读软件的名称、版本号、算法的建立和优化过程。

3.2.2 对于 SSO 方法，以图示结合文字的方式描述检测流程。提交扩增、杂交、荧光素（SA-PE）标记、上机检测各个步骤中反应体系和反应程序的研究资料。SSO 方法依靠悬浮液相芯片系统，详细描述未包含在试剂盒组分中但需配套使用试剂和仪器，描述各试剂的组分和作用，提交仪器的质控、校准和调试过程的研究资料。明确质量控制参数，包括微珠最低读数、阴性质控微珠最高值、探针阴/阳性反应判断正确性等的接受标准。

SSO 与荧光 PCR 方法或熔解曲线法类似，因此应当详细描述配套使用数据分析和判读软件的名称、版本号、算法的建立和优化过程。

### 3.2.3 高通量测序方法

申请人提供整个检测流程的标准操作程序文件（Standard Operating Procedure, SOP），对检测全过程包括样本收集处理、文库制备、测序、数据分析、结果报告等过程进行描述。

文库制备。以图示结合文字的方式描述最终所得文库 DNA 片段的结构组成，至少包括与测序芯片结合的测序接头，样本标签序列，测序引物结合序列和 DNA 靶序列等。详细描述文库制备的步骤和各步骤中反应体系和反应程序的优化选择过程，如 DNA 片段化的方法和参数，优化的指标包括打断后片段大小、片段分布是否集中，随机性等；末端修复和接头连接的过程；靶区域捕获的方法和文库扩增等。描述文库质检要求，包括文库 DNA 片段大小、质量浓度和摩尔浓度等。文库

浓度检测方法包括但不限于荧光染料法；文库片段大小检测方法包括但不限于毛细管电泳法等。

对于联合探针锚定聚合测序法，详细描述单链环化和 DNA 纳米球（DNB）的制备和优化过程。

上机测序时文库 DNB 浓度/DNA 浓度/摩尔浓度要求。文库定量后需调整 DNA 浓度/摩尔浓度，以提高测序质量。申请人应当依据适用仪器的不同特性，对上机测序文库 DNA 浓度/摩尔浓度进行研究，并提交 DNA 浓度转化为摩尔质量的公式。

测序。文字结合图示的方式详细描述测序仪的参数设置包括读长、通量、测序模式、标签序列信息和测序时间等。提交测序通用试剂的说明书和各组分真实图片，详细描述测序试剂的试剂组成和各组分的功能。若研发过程中对测序通用试剂进行了个性化调整包括但不限于组分的微调，特异性成分的添加，缓冲液的改良等，应当详细描述调整的内容和原因。详细描述下机原始数据的质量控制标准，包括簇密度、簇通过率、DNB loading 率、Q 值、碱基质量分布（每个位置上的碱基质量分数分布情况）、GC 含量（DNA 分子中 G+C 所占的比例）、测序 reads 中未确定碱基（N）的比例、接头/引物比例、总数据量（reads/碱基数）、质控处理后的有效碱基数或 reads 数、平均读长、序列复杂度（测序 reads 中独特序列的比例）和标签拆分率（混合样本测序中，能够正确识别并分配给原始样本的 reads 比例）等。

生信分析。以流程图的方式展示生信分析的过程。详细描述对原始数据进行数据过滤的过程，包括所用软件名称和版本号，过滤方法和参数如去除质量低于 Q30 的碱基、引物二聚体

序列、重复序列、去除接头序列（标签序列、引物序列、测序引物结合序列），明确有效数据的质量可接受标准，注明有效数据比例和有效 reads 数。与现用版本 IPD-IMGT/HLA 数据库的参考序列（reference alleles，如 HLA-A\*01:01:01:01 为 HLA-A 基因座的参考序列）进行序列比对。以图文结合的形式详细描述序列比对的过程，包括所用数据库版本号、软件名称、参考序列、比对策略、比对后数据的可接受标准如比对率、与参考序列相比的覆盖率和覆盖均一性、有效测序深度（平均深度和最小深度）、重复率、DNA 片段长度的分布情况、碱基错配比率、GC 偏倚等。因为大多数人的 HLA 基因型为杂合型，即两条染色体上的等位基因不相同，HLA 基因分型检测试剂需构建单倍体，以确认样本的具体型别。此处所指的单倍体构建指的是针对单一基因座进行的等位基因序列拼接。申请人应当详细描述单倍体拼接/构建的策略、具体方法、所用数据库的构建方法和最终的质量控制。详细描述单倍体构建后 HLA 基因型的推断过程和质量控制标准。提交单倍体拼接和 HLA 基因型推断过程中所用算法的信息，阐述算法的建立和优化过程。

HLA 分型数据的要求。包括  $Q30 > 80\%$ 、测序深度要求（最低测序深度、平均测序深度）、测序均一性、靶区域测序覆盖率、序列拼接长度或平均 reads 长度、高背景碱基的识别和判断、单倍体/等位基因序列拼接、等位基因平衡等。其中测序均一性要求 reads 片段在检测区域均匀分布；测序覆盖度要求各基因位点测序序列 100% 覆盖目标区域，尤其是关键外显子区域必须完全覆盖并达到所要求的测序深度。对于高背景碱基的识别和判断，其出现的位置和碱基类型固定，常与等位

基因有关，造成结果分析错误；申请人需提交影响结果分析的高背景碱基位置、类型及比例，建立碱基有效识别及无效识别的判断标准，在后续结果分析中加以分析。高背景碱基应当排除移植后送检样本因错配移植产生的等位基因嵌合。申请人应当阐述单倍体/等位基因序列拼接过程中无法完全拼接的原因及其影响。等位基因平衡指的是等位基因多态性位置两个碱基的比例，区分纯合位点或杂合位点；当两个碱基比例相近时判为等位基因平衡，当低于可接受的阈值时判为等位基因不平衡。申请人应当提供等位基因不平衡的判断标准，并在说明书中进行提示。

### 3.3 检测结果的报告形式和注释

依据产品设计和性能，参考《人类白细胞抗原基因分型方法分辨水平的专家共识》中 HLA 基因分型结果的描述方式，描述检测结果的报告形式及其所代表含义。

### 4. 阳性判断值研究

对于低/中分辨率产品，阳性判断值包括检测信号的阴阳性判断和等位基因确认两部分。对于高分辨率产品，阳性判断值研究包括测序质量符合要求的情况下，等位基因确认的过程，此部分研究资料可在反应体系研究 3.2 中提交，也可在阳性判断值项下提交。

研究样本为预期使用人群的真实样本，涵盖中国人群所有 **Common** 等位基因。申请人应当详述试验方案，列明所用试剂、仪器和软件、对比方法、样本量、样本入组标准；提交阳性判断值研究所用样本的背景信息列表，至少包括性别、年龄、来源、唯一可溯源编号、临床诊断信息（对比方法的检测结果）

及申报产品的检测结果等。

若申报产品同时采用人工判读和软件判读两种判读模式，请详细描述两种方式的判读规则及研究资料。考虑到产品特性，人工判读较为复杂，请提交人工判读准确性的研究资料，以及人工判读和软件判读的一致性研究资料。

若结果出现模糊判读情况，应当给出解决方案。

## 5. 主要原材料研究

该类产品的原材料包括引物、探针、酶（连接酶、聚合酶、限制性内切酶、DNA 聚合酶等）、dNTP、接头、标签、核酸分离/纯化组分、质控品、参考品等。申请人可参考《体外诊断试剂主要原材料研究注册审查指导原则》进行主要原材料研究和注册申报资料的准备。除前述指南的通用要求外，建议申请人额外注意以下内容：

### 5.1 引物和探针

低分辨率/中分辨率产品的检测靶区域多局限在 HLA-I 类基因的 2 和 3 号外显子，HLA-II 类基因的 2 号外显子，部分基因座会涉及 3 号外显子。采用高通量测序方法的高分辨率产品，检测靶区域多为各基因座的全长、全外显子或关键外显子区域。

详述引物和探针的设计原则，提供引物和探针序列、靶基因序列及两者的对应情况。建议在各基因座序列比对的基础上标明每个引物/探针的位置和核苷酸序列，从而清晰展示引物/探针设计的包容性和特异性。

对于低/中分辨率产品，引物/探针的设计既要包含同一血清型下所有的等位基因，又要与其他血清型进行区分。对于高分辨率产品，建库原理不同（如扩增子法和杂交捕获法），所

需的引物/探针设计不同，但均在数据库全等位基因序列多重比对的基础上考虑包容性和特异性进行。

因此在完成引物和探针设计后应当与 HLA 等位基因序列数据库进行序列比对，与人类基因非目标区域和常见入血的病原体基因进行同源比对，分析所设计引物/探针的包容性和特异性。

## 5.2 接头和标签

申请人应当明确接头序列和标签序列，提供接头和标签的设计依据及研究资料。

## 5.3 质控品

阳性质控品包括代表性等位基因。同时设置不含待测靶序列的空白质控品用于交叉污染的质控。

质控体系应当能够对检测全过程进行有效的质量控制，包括试剂及仪器性能、可能的扩增反应抑制物（管内抑制）、交叉污染等因素造成的假阴性或假阳性结果。质控品可采用临床样本核酸提取液、国际公认的参考盘或细胞系。质控品应当参与样本核酸的平行提取。申请人应当针对质控品原料来源、选择、制备、定值过程等提供详细的研究资料，并对质控品的检测结果做出明确要求。

## 5.4 内标

建议低/中分辨率产品设置内标，以质控样本质量、扩增过程和检测过程。申请人需对内标的引物、探针设计和相关反应体系的浓度进行研究，同时明确内标检测结果的可接受标准。

## 5.5 企业参考品

建议申请人建设企业参考品库，覆盖所有的 Common 等位

基因、部分 **WD** 等位基因和 **Rare** 等位基因。样本来源首选真实样本或其 **DNA** 提取液，次之为真实样本与国内外公认参考盘的组合；对于 **WD** 等位基因和 **Rare** 等位基因可采用细胞系。

提交企业参考品库的原料来源、选择、制备、浓度及等位基因确认方法（建议采用高分辨率或等位基因分辨率方法进行确认）或试剂等相关研究资料。

每批次产品出厂检用企业参考品的设置至少包括准确度参考品和精密度参考品。

准确度参考品。对于低/中分辨率产品，准确度参考品应覆盖 **Common** 等位基因和部分 **WD** 等位基因，浓度水平为上样 **DNA** 浓度要求的下限。此处的 **Common** 等位基因覆盖范围与 2.3 精密度研究中的一致。对于高分辨率产品，准确度验证所用样本应具有代表性的和挑战性，覆盖 60% 的 **Common** 等位基因和一部分的 **WD** 等位基因，浓度水平为上样 **DNA** 浓度要求的下限。

精密度参考品。选取不同浓度水平包括上样要求的最低 **DNA** 浓度和中阳性样本（正常白细胞浓度水平样本）的至少 5 个样本进行制备。精密度参考品建议优先选择未纳入准确度参考品的 **Common** 等位基因和选择具有挑战性的等位基因，如低/中分辨率产品中需多个引物/探针扩增才能确定的等位基因，高分辨率产品中单倍体型拼接和型别确认困难或易出现等位基因不平衡的样本。

### （三）临床评价资料

临床试验的开展、方案的制定以及报告的撰写等均应符合《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》《关于发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》及《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》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。

### 1. 临床试验机构

应当选择至少 3 家（含 3 家）按要求备案的临床试验机构，按照相关法规的要求开展临床试验。建议申请人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临床试验机构。

### 2. 临床试验方法

建议选择境内已批准上市的高分辨试剂（如有）或实验室参考方法（如一代测序、二代测序及组特异性测序引物检测）进行对比试验研究。

如产品纳入了新的等位基因位点，应提交相应基因位点临床意义的证据。

如采用实验室参考方法，应当提供临床试验机构确认的参考方法的详细资料，如：标准化 SOP、方法原理、所需试剂及仪器、参考方法的性能验证、参考方法质控、数据及典型的试验图谱等。

对于不一致及模棱两可（多种可能判定）的结果，应当结合其他检测方法的结果及临床确认结果进行分析。

### 3. 受试者选择和样本类型

#### 3.1 受试者选择

如预期用于实体器官移植，受试者应当为相应器官移植的供受者及潜在供者。

如预期用于造血干细胞移植，受试者应当为造血干细胞移植的供受者及潜在供者。

供、受者均可入组，注意受者应当有一定例数。

### 3.2 样本类型

适用的样本类型一般为静脉全血。临床试验应当纳入临床原始样本，不应直接采用提取的基因组 DNA 进行试验。临床样本的采集、处理、保存和提取等应当同时满足申报产品说明书以及对比试剂说明书的相关要求。

### 4. 临床试验样本量

样本量应当满足统计学要求，经统计学估算，建议总样本量不低于 1500 例。

人类 HLA 等位基因亚型按照出现频率可分为常见型、确认型和罕见型。临床试验中应当对常见型进行充分验证，每种常见型均应当具有一定的阳性例数：频率达到 0.9% 及以上的亚型，应当分别不少于 15 例；频率低于 0.9% 的常见型，原则上应当均有纳入。

此外应当入组部分确认型别及罕见型别样本。对于包括 A、B、C、DRB1、DQB1 基因的高分辨率的产品，建议确认型别及罕见型别覆盖不少于 90 种。

常见、确认及罕见型等位基因的定义以最新的中国常见及确认的 HLA 等位基因表（CWD）为准。

### 5. 统计学分析

应当对入组人群进行人口学分析（年龄、性别、民族等）以及临床诊断背景信息等。

应当统计临床试验中各基因亚型纳入情况，并参考 CWD

表对应列出基因频率。

基因型第一区域结果分析：

应当以  $N \times N$  表分别总结两种试剂的各基因座内血清型的定性检测结果，计算各型符合率和总符合率及 95% 置信区间。

高分辨产品的基因型第二区域结果分析：

应当以  $N \times N$  表分别总结两种试剂的各基因亚型的定性检测结果，计算各亚型符合率和各基因座总符合率及 95% 置信区间。

对于高分辨率的产品，基因亚型结果总符合率 95% 置信区间下限应当不低于 99.7%；对于低分辨率的产品，第一区域结果总符合率 95% 置信区间下限应当不低于 99.7%。

对于高通量测序原理的试剂，应当对样本质量和数据质量进行总结分析，并分层统计相应指标在不同水平下的样本分布。包括有效数据量（reads 数）、Q30 值、测序深度（平均深度及最低深度）、靶区域测序覆盖率、均一度（测序深度达到 20% 平均深度的区域占覆盖区域的比例）、序列拼接长度或平均 reads 长度、等位基因平衡比例。其中临床试验中测序有效数据量应当满足说明书要求，且不应当过度冗余。

不一致的样本应当明确其具体的基因型及相关引物/探针，并有合理的解释。对于高通量测序原理的试剂检测不一致的结果，应当结合数据质量分析解释。

如涉及软件判读，应当总结结果分型表判读与软件判读结果，计算其符合率和总符合率及 95% 置信区间。

## 6. 伦理学要求

临床试验应当遵守《世界医学大会赫尔辛基宣言》的伦理

学准则。研究者应当考虑临床试验用样本的获得和试验结果对受试者的风险，提请伦理委员会审查，并获得伦理委员会的同意。注册申报时应当提交伦理委员会的审查意见。

#### 7. 临床试验方案

各临床试验机构应当执行同一方案，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。试验方案应当确定严格的入选/排除标准，任何已入选的样本被排除出临床试验都应当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当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/方法应当保持一致，以便进行合理的统计学分析。

#### 8. 临床试验报告撰写

临床试验报告应当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，并应当包括必要的基础数据和统计分析方法，最后得出临床试验结论。

对于基于高通量测序的试剂，报告中应当明确所配套使用的测序仪、测序模式、生物信息数据分析软件及参数、测序试剂等具体信息。数据汇总表中应当包括初始样本的核酸浓度、有效数据量（reads 数）、Q30 值、测序深度（平均深度及最低深度）、测序覆盖率、均一度（测序深度达到 20% 平均深度的区域占覆盖区域的比例）、序列拼接长度或平均 reads 长度、等位基因平衡比例。

#### （四）产品说明书

说明书编写应当符合《体外诊断试剂说明书编写指导原则

(2023年修订版)》的要求。申报产品说明书在符合前述指导原则的基础上,应当注意:

1.【预期用途】应当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静脉外周血样本中基因组DNA的人类白细胞抗原I类\*基因,II类\*基因的等位基因。

具体的临床用途为:

用于白细胞抗原低/中分辨率分型,为肝/肾等实体器官(明确具体器官)移植供受者的选择提供参考。

用于白细胞抗原高分辨率分型,为造血干细胞移植供受者的选择提供参考。亦可为肝/肾等实体器官(明确具体器官)移植供受者的选择提供参考。

1.2 潜在的供体/受体DNA分型并不是影响患者的临床决定的唯一测试;在做出决定移植之前,需要进行淋巴细胞毒性交叉匹配等实验。

1.3 明确本产品检测结果仅供临床参考,临床医生应当结合患者病情、疗效及其他实验室检测指标等对本产品的检测结果进行综合判断。

2.【主要组成成分】

需要但未提供部分请明确配套使用分析软件注册证号及其发布版本号。

3.【检验原理】

明确检测靶基因的具体区域,如SSO方法中HLA-A等位基因的扩增检测区域为2号外显子和3号外显子,高通量测序方法的扩增检测区域为A基因全部外显子或者A基因全长。

4.【检验方法】

明确核酸提取过程中全血样本用量。

详细描述检测过程和反应步骤，明确各步骤的质量控制标准。其中高通量测序方法应明确下机原始数据的质量控制标准和生信分析后的可接受质量标准，如  $Q30 > 80\%$ 、测序深度要求（最低测序深度、平均测序深度）、测序均一性、靶区域测序覆盖率、序列拼接长度或平均 reads 长度、高背景碱基的识别和判断、等位基因序列拼接、等位基因平衡等。

### 5. 【检验方法的局限性】

明确无法准确分型的等位基因。

明确申报产品针对所有中国人群常见等位基因和一部分的 WD 等位基因进行了验证，其他未验证的基因型别可能存在无法检出或检出错误的情形。

6. 针对低/中分辨率产品，说明书增加附件，列表明确产品的孔位布局图，各孔位的阳性判断值和依据各孔位阴阳性确定等位基因的结果判读表。

## 三、参考文献

[1] 《医疗器械监督管理条例》（中华人民共和国国务院令 第 739 号）[Z].2021.

[2] 《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令 第 48 号）[Z].2021.

[3] 《体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式》（国家药品监督管理局公告 2021 年第 122 号）[Z].2021.

[4] 《体外诊断试剂分类目录》（国家药品监督管理局公告 2024 年第 58 号）[Z].2024

[5] 《医疗器械注册单元划分指导原则》（国家食品药品监

督管理总局通告 2017 年第 187 号) [Z].2017.

[6] 《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》（国家药品监督管理局通告 2021 年第 72 号） [Z].2021

[7] WS/T 785-2021 人类白细胞抗原基因分型检测体系技术标准. [S].

[8] 人类白细胞抗原基因分型技术平台规范化建设及临床应用专家共识 [S].

[9] 人类白细胞抗原基因分型方法分辨水平的专家共识[J]. 中国输血杂志, 2024.

[10] 中国造血干细胞捐献者资料库 HLA 基因分型数据入库标准(2023 版) [Z].

[11] Definitions of histocompatibility typing terms: Harmonization of Histocompatibility Typing Terms Working Group.[J].Hum Immunol. 2011.

[12] Nomenclature for factors of the HLA system.[J]. Einstein. 2011.