附件3

人*Septin 9*基因甲基化检测试剂

非临床研究审评要点

本审评要点主要针对人*Septin 9*基因甲基化检测试剂的分析性能、阳性判断值、稳定性、主要原材料及生产工艺等研究过程，为体外诊断试剂注册申请人和技术审评部门提供参考。

本审评要点是对人*Septin 9*基因甲基化检测试剂的一般要求，注册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。

本审评要点是供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审评要点。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。

本审评要点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

本审评要点适用于采用实时荧光PCR法，对人外周血血浆中*Septin 9*基因的甲基化进行体外定性检测的试剂。可用于临床结直肠癌疑似患者的辅助诊断。

*Septin*系列基因是一类具有三磷酸鸟苷活性的保守基因家族，参与多种生物过程。*Septin 9*是*Septin*家族的一员，广泛存在于人类细胞中，位于17q25.3，含有17个外显子，存在多个转录产物。甲基化的*Septin 9*基因是结直肠癌早期发生、发展过程中的分子标志物之一。

对于*Septin 9*基因甲基化与其他标志物联合检测的试剂，应结合适用的预期人群、样本类型、临床适应症等，针对联合检测的非临床性能进行充分研究。

对基于其他样本类型、方法学或检测靶标的试剂，可能部分要求不完全适用或本文所述内容不够全面，注册申请人可以参照本审评要点，根据产品特性对适用部分进行评价或补充其他的评价资料进行相应验证。

本审评要点适用于进行产品注册和变更注册申报的产品。

1. 注册审查要点

（一）监管信息

1.产品名称及分类编码

产品名称应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》及相关法规的要求，如*Septin 9*基因甲基化检测试剂盒（PCR荧光探针法）。按照《体外诊断试剂分类规则》，该产品按照第三类体外诊断试剂管理，分类编码为6840。

2.注册申请人还需提交产品列表、关联文件、申报前与监管机构的联系情况和沟通记录及符合性声明等文件。

（二）综述资料

内容应符合《医疗器械监督管理条例》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》的相关要求，主要包括概述、产品描述、预期用途、申报产品上市历史及其他需说明的内容。建议申请人着重介绍以下几方面内容：

1.产品描述中应详述检测原理、血浆游离DNA 提取方法原理、甲基化检测原理、DNA转化原理、PCR检测原理，此外描述引物探针设计原则及其与检测位点的对应关系，检测基因及甲基化位点信息、筛选过程、选择依据以及结果判断方法等，提交文献依据。介绍靶基因及其其甲基化的生物学特征及临床意义，提交文献依据。明确内标与质控的设置和选择依据，如有防污染措施，需描述防污染的原理。

2.与同类和/或前代产品的比较，应着重从方法学、检验原理、样本类型、检测的基因名称、引物覆盖的检测区段、探针覆盖的甲基化位点、组成成分、内标、质控物、判读规则、分析性能、临床性能以及临床用途、适用人群等方面详细说明申报产品与目前市场上已获批同类产品之间的异同，如需联合其他基因甲基化实现预期用途，同时需比较联合检测的靶标单独和组合信息，并明确申报产品组合特征与患者受益情况。

3.预期用途需明确适用人群、样本类型、基因名称、检测的甲基化位点、基因区段及临床用途。需提交临床适应症的发病原因、临床症状、流行病学特征、该疾病相关筛查、诊断及有效治疗方法，明确现有方法临床应用的优缺点。详述检测靶点与预期用途之间的关系，提供相关指南或权威文献。描述*Septin 9*基因在肿瘤不同分期组织中的甲基化状态以及在其他肿瘤及非肿瘤组织中的甲基化状态，提供参考文献。

4. *Septin 9*基因的甲基化检测如需结合其他检测试剂共同实现预期用途，需提交联合使用的检测试剂盒的上市信息，并提供具体的被测基因、位点、检验原理、检测方法、阳性判断值及结果判读方法等信息。整个检测系统应已定型。

（三）非临床资料

1.产品技术要求及检验报告

1.1 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、前期评价等结果，依据国家标准、行业标准及有关文献资料，结合产品特性按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》[（2022年第8号）](https://www.cmde.org.cn/directory/web/WS01/images/0r3Bxsb30LWy+sa3vLzK9dKqxOx4NC01ri1vNSt1PKjqDIwMjLE6rXaOLrFo6kuZG9j.doc)的要求编写产品技术要求。该类产品作为第三类体外诊断试剂，应将主要原材料及生产工艺要求等内容作为附录附于产品技术要求正文后。

如有适用的国家标准、行业标准，产品技术要求的相关要求应不低于相应的要求。

1.2产品检验报告

根据《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》的要求，申请人应当提供三个不同生产批次产品的检验报告，有适用的国家标准品，应当使用国家标准品对产品进行检验。报告形式可为申请人出具的自检报告或委托有资质的医疗器械检验机构出具的检验报告。申请人开展自检的，应当符合《医疗器械注册自检管理规定》及相关法规的要求。

2.分析性能研究

注册申请人应当在原材料和生产工艺经过选择和确认、质量管理体系得到有效控制并且保证产品质量稳定的基础上，采用完整、确定的检测系统进行分析性能评估，包括具体研究方法、质控标准、试验数据、统计分析等详细资料。对于本类产品建议着重对以下分析性能进行研究：

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。

每项性能评估应尽量采用与适用样本类型一致的临床样本进行研究。不同样本类型应分别进行研究。

分析性能评估内容包括样本稳定性、适用样本类型、DNA提取/纯化性能及甲基化DNA转化性能、准确度、精密度、检出限、特异性、反应体系等研究。

2.1样本稳定性

样本稳定性可包括样本处理不同阶段的样本稳定性研究，一般包括样本各种实际运输及储存（常温、冷藏和冷冻）条件下的保存期限验证，以确认样本的保存条件及保存时间。可以在合理的温度范围内，每间隔一定的时间段即对储存样本进行验证，从而确认不同类型样本的稳定性。可冷冻保存的样本还应对冻融次数进行合理验证。应明确具体的保存温度范围。

如核酸提取产物可保存，还需对核酸提取产物的保存条件和保存时间进行研究。

如甲基化DNA转化后的样本可保存，需提交转化后的样本稳定性研究资料。

2.2适用样本类型

明确适用的样本类型。如有不同样本类型或适用于不同抗凝剂，需提交样本类型适用的研究资料。

2.3 DNA提取/纯化性能及甲基化DNA转化性能

在进行DNA甲基化检测前，应有适当的核酸提取/纯化步骤。应根据样本类型、检测目的选择DNA提取纯化方法。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、DNA完整性进行评估，此外需结合试剂对检出限、重复性、抗干扰性能等进行充分的验证，并评价该方法能否满足该类产品的要求。循环游离DNA（circlulating cell-free DNA，cfDNA）的提取纯化和处理应考虑避免基因组DNA的污染。不同样本类型应分别进行核酸提取/纯化性能的研究验证，根据样本类型制定质量合格标准并进行评价。应采用真实适用样本进行提取效率的研究。

DNA甲基化检测需要针对不同的样本类型与检测应用选择适宜的转化方法。对于通过重亚硫酸盐处理DNA的情形，应提交重亚硫酸盐处理试剂的筛选研究、不同甲基化比例的样本的转化效率研究、DNA的回收效率等性能研究，设定相应的质量标准。

2.4准确度

采用申报产品和对比方法对经临床诊断确定后的不同核酸浓度和甲基化水平临床样本进行平行检测，评估申报产品的准确度。应包括一定数量的阳性和阴性及干扰样本。

2.5精密度

使用不同浓度和不同甲基化比例的临床样本，采用三批试剂对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，应考虑运行、时间、操作者、仪器、试剂批次和地点等影响精密度的条件，设计合理的精密度试验方案进行评价。精密度评价试验应包含核酸提取/纯化及甲基化DNA转化步骤。

2.6检出限

检出限研究的目的是考察在一定量的适用样本DNA浓度背景下能够检测的甲基化阳性样本最低比例，该背景DNA浓度建议参考患者血浆cfDNA浓度 。

2.6.1检出限的确定

对不同DNA浓度下含有不同比例甲基化DNA的样本进行检测，确定样本的检出限。可使用不同浓度、不同甲基化比例的模拟样本进行研究，采用临床阴性基质进行稀释，每浓度梯度使用三批试剂分别在适用机型上检测至少20次，将检出率大于等于95%的最低浓度水平确定为检出限。也可选用其他合理方法进行检出限的建立。

2.6.2检出限的验证

检测限的验证可使用三批试剂在适用机型上对检出限浓度水平的临床样本检测至少20次，阳性检出率应不低于95%。检出限可表示为xx浓度的野生型DNA背景下\*%的*Septin 9*甲基化DNA。

2.7 特异性

2.7.1交叉反应

应考虑含非目标基因甲基化的其他甲基化基因、*Septin 9*基因扩增片段SNP位点、非甲基化*Septin 9*基因等对检测结果的影响。

特异性验证样本包括可转移到结直肠的其他原位癌种、其他常见癌种（对于结直肠癌辅助诊断预期用途，包含但不限于其他消化道癌种等）以及其他良性疾病（如息肉、痔疮、胃肠道间质瘤等）相关基因甲基化阳性的人血浆样本。若有交叉反应，应进行风险分析。

2.7.2 干扰试验

应针对可能的内源和外源性干扰物，采用弱阳性样本对高浓度干扰物质进行干扰试验研究。内源性干扰物包括脂肪酸、甘油三酯、胆固醇、血红蛋白、血红素、胆红素等。药物包括胃肠道疾病常用药物、抗生素（如阿莫西林、甲硝唑、头孢曲松钠、左氧氟沙星等）、对乙酰氨基酚、质子泵抑制剂（如奥美拉唑等）、胃粘膜保护剂（如硫糖铝等）、胃肠道动力药（如吗丁啉等）、H2受体拮抗剂(如西咪替丁等）、降血脂药（他汀类）、降血压药等。

对多重PCR反应体系中的不同检测靶标间的相互干扰进行研究。

2.8反应体系

2.8.1 确定最佳反应体系的研究资料，包括甲基化DNA转化用核酸样本体积，甲基化DNA转化反应体系及反应条件（如涉及），反应体系中的加样量、试剂用量、反应体系各成分终浓度(如酶浓度、引物/探针浓度、dNTP浓度、阳离子浓度等)。对于多重PCR反应体系，应针对靶标与内标的扩增效率及相互影响进行充分研究。

2.8.2提供PCR反应各阶段温度、时间及循环数、荧光采集时间的研究资料。

2.8.3 提供不同机型基线、阈值、阈值循环数（Ct）、荧光强度确定的研究资料。

2.8.4 提供质控体系设置、Ct值确定的研究资料。

2.8.5 不同适用机型的反应条件如果有差异应分别详述，并提交验证资料。

2.8.6 如申报产品包含核酸分离/纯化试剂，应提交对核酸分离/纯化过程进行优化的研究资料。研究确定最佳核酸提取反应体系，包括核酸提取使用的样本体积、洗脱体积、离心条件等。

3.稳定性

申报试剂的稳定性主要包括实时稳定性（有效期）、使用稳定性（如开瓶稳定性、复溶稳定性（如适用）、机载稳定性（如适用）等）、运输稳定性、冻融次数限制（如适用）研究等。申请人可根据实际需要选择合理的稳定性研究方案。稳定性研究资料应包括研究方法的确定依据、具体的实施方案、详细的研究数据以及结论。

实时稳定性研究应采用至少三批试剂在实际储存条件下保存至成品有效期后，选取多个时间点进行产品稳定性研究。

4.阳性判断值

建议申请人纳入一定数量的临床样本，结合产品特性可采用受试者工作特征（ROC）曲线或其他合理方法确定靶标基因阳性判断值。采用临床来源的未经治疗的样本，根据预期用途可纳入目标癌种、癌前病变、其他需鉴别诊断的恶性肿瘤、良性疾病等样本进行阳性判断值研究，包括不同病理类型、不同的分期、不同甲基化比例及阳性判断值附近的样本，并对不同分期分别进行统计。

提交内标基因的Ct值确定研究资料，可采用百分位数法确定内标基因的Ct值范围。

申请人应详细阐述所采用方法的选择依据，提交详细研究方案、建立和验证设计、试验数据和统计分析过程。明确所用样本类型、样本来源、样本量估算的方法、样本例数、临床背景信息、基因甲基化确认过程及数据等信息。临床背景信息至少包括性别、年龄、临床诊断信息、样本来源机构、检测结果等信息。

如试剂判读存在灰区，应提交灰区范围确定的研究资料。

5.其他资料

5.1主要原材料研究资料

主要原材料研究资料通常可包括核酸提取试剂/纯化试剂、DNA转化试剂、DNA捕获序列（如有）、引物、探针、DNA聚合酶、UNG酶（如有）、dNTP等，此外还包括对照品/质控品及企业参考品。申请人应提交相关原材料的来源、选择、制备方法的研究资料，质量分析证书，质量标准的制定和检验资料。如为申请人自制，应提供其详细制备过程；如为外购，还应提交生产商筛选资料以及生产商提供的原材料质量检定报告。

5.1.1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。如产品不包含提取试剂，则需明确配套的核酸提取/纯化试剂并提交相应的提取效率验证资料。

5.1.2 DNA转化试剂，明确主要组成、原理介绍及相关的验证资料。如产品不包含DNA转化试剂，则需明确配套的DNA转化试剂并提交相应的转化性能验证资料。

5.1.3 引物、探针

注册申请人应详述*Septin 9*基因及内标基因（如适用）、引物、探针的设计原则，扩增区段，检测覆盖的甲基化位点及其所在基因位置并提供选择依据，同时应提供捕获序列、引物、探针核酸序列及其对应的转化前后基因序列及对应关系，明确相应的甲基化与非甲基化位点。提交详细的筛选研究数据。

注册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：序列准确度、纯度（HPLC纯等）、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。注册申请人应明确评价方法，并依据评价结果建立合理的质量标准。

5.1.4酶

酶包括DNA聚合酶和/或尿嘧啶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。如有降低Taq酶非特异性扩增的措施，需详细描述（例如采用热启动酶，Taq抗体等）。

DNA聚合酶应具有DNA聚合酶活性，无核酸内切酶活性，具有5’-3’外切酶活性（如适用），具热稳定性。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。

5.1.5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。

5.1.6对照品/质控品

注册申请人应根据试剂检测原理设置各种对照品（质控品）来实现对产品整个反应体系的有效监控。阴性和阳性质控品一般为一定浓度的甲基化阴性和阳性样本。空白对照为不含靶核酸的溶液。对照品应参与样本核酸的平行提取。注册申请人应提供对照品原料选择、制备、基因序列确认、拷贝数及浓度确定过程、内参基因与靶基因的比例确定等的详细研究数据，并对其检测结果做出明确的范围要求。

注册申请人应对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制，明确所采取的具体措施（如设置内标等）、选择依据，并提交相应研究资料。

5.1.7企业参考品

企业参考品可包括*Septin 9*基因甲基化阳性参考品、*Septin 9*基因甲基化阴性参考品、精密度参考品、检出限参考品。注册申请人应提交企业参考品的具体组成、原料来源、选择、制备方法、阴阳性或甲基化状态确认、DNA浓度确认以及检验标准等的详细研究资料。可采用临床样本或来源于细胞系片段化DNA样本。*Septin 9*基因相应位点甲基化阳性以及*Septin 9*基因相应位点甲基化阴性样本作为原料进行参考品的制备，样本应明确其来源及甲基化状态，并提交确认资料。若采用细胞系，如为自制，需提交详细的细胞系构建资料及确认资料；如为外购，应提供生产商名称、细胞系名称、细胞类型、基因型信息及确认资料，并提供生产商提供的质检报告。

阳性参考品应包括不同DNA浓度以及一定 DNA 浓度下不同甲基化 *Septin 9*基因比率的样本；

阴性参考品为一定 DNA 浓度下不含甲基化*Septin 9* 基因、含有低于检出限的甲基化*Septin 9*基因、含有其他基因甲基化以及含有不同干扰和交叉反应成分的样本。

精密度参考品应至少包括低、中高不同DNA浓度及在一定浓度下*Septin 9*基因甲基化阴性、低甲基化比例、中高甲基化比例的样本。

检出限参考品：应包括DNA浓度和*Septin 9*基因甲基化比例均处于检出限水平的样本。

5.2 生产工艺

介绍产品的主要生产工艺，可用流程图结合文字的方式表述，提交主要生产工艺的确定及优化研究资料。