附件4

应用于结直肠癌筛查及辅助诊断的

粪便多靶点联合检测试剂

非临床研究审评要点

本审评要点主要针对粪便多靶点联合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。

本审评要点是基于特定申报产品的基因点突变、甲基化及便隐血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，但是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，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免疫法和实时荧光PCR法，体外定性检测人粪便样本中血红蛋白联合基因点突变和/或基因甲基化的联合检测试剂。检测结果通过计算综合评分，用于对结直肠癌高风险人群的筛查或临床结直肠癌疑似患者的辅助诊断。

对于适用于其他样本类型，不同检验原理或组合形式的联合检测产品，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。

二、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，明确突变基因、甲基化基因、便隐血等检测靶标。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：

申请人应依据临床上结直肠癌筛查与诊疗的相关要求，对高风险人群的选择提供充分的支持资料，包括诊疗指南或专家共识等。多项标志物的选择及组合应具有科学性和临床价值。应详述靶基因、突变位点、甲基化位点的筛选依据及过程。介绍靶基因、点突变及甲基化的生物学特征及临床意义，中国人群点突变频率，基因甲基化的组织特异性，提供健康人基因甲基化的基线水平等相关信息，提交文献依据。

比较多项标志物联合检测与单项标志物检测的诊断效能差异，还应与临床已有公认的筛查方法比较异同，确认多项标志物联合检测的产品设计具有临床价值。

产品描述中应详述各靶标检测原理，引物探针设计及其与检测位点的对应关系，内标选择与质控的设置，如有防污染措施，需描述防污染的原理。阳性判断值需计算后进行判读的产品，应详述计算原理、系数选择和判读规则。

（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的，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.分析性能评估

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。

当产品包含多项被测物时，原则上应针对所有被测物分别进行检测性能评价。如不适用，应提供充分的理由和依据，并采用合理的方法进行检测性能评价。

需多靶标综合判断阴阳性的产品，除单项被测物的性能评价研究外，还应提供综合检测结果评价资料。

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、分析特异性、钩状效应等研究。

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

产品适用的样本类型为人粪便样本。根据布里斯托（Bristol）大便分类法，粪便样本分为7个型别。应收集7种型别的粪便样本，分别对不同型别的检出结果进行研究。对不适用粪便类型应在说明书明示。

2.3 DNA提取/纯化性能及甲基化DNA转化性能

申请人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。

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

使用经确认的临床样本进行检测，包括进展期腺瘤以及不同分期（I-IV）的结直肠癌样本，评价申报产品基因点突变/甲基化检测结果与对比试剂/方法检测结果的一致性；评价申报产品便隐血检测结果与已上市试剂检测结果的一致性。

针对所有被测基因，建议采用境内已上市同类产品作为对比试剂，与之进行比较研究。如选择同类产品，应确认具有良好的可比性。如该基因点突变/基因甲基化检测尚无同类产品上市，可采用适合的基因检测实验室参考方法作为对比方法，例如Sanger测序法、NGS、数字PCR等。

需多靶标综合判断阴阳性的产品，除单项被测物的准确度评价研究外，还应提供综合检测结果的评价资料，可与最终病理结果比对。

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

在不同DNA浓度下（该背景DNA浓度建议参考患者粪便样本），对含有不同比例基因突变、不同比例DNA甲基化的样本进行检测，确定样本的检出限。可使用不同DNA浓度、不同甲基化比例的样本进行研究，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。

研究便隐血检测试剂对低浓度血红蛋白的阳性检出率，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。

检出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\*%的基因突变及DNA甲基化。便隐血检测试剂的检出限表示为xx浓度。

2.7分析特异性

2.7.1交叉反应

采用靶基因的野生型及其他常见突变的样本、甲基化靶基因的未甲基化样本或其他常见位点的甲基化样本进行交叉反应研究。便隐血项目应考虑血红蛋白结构类似物对产品检测结果的影响。

采用其他恶性肿瘤尤其是消化道恶性肿瘤患者（如食道癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌等）、消化道良性疾病患者（如炎症性肠病、消化道溃疡、结直肠息肉等）粪便样本，评价对本试剂检测结果的影响。

2.7.2干扰试验

对于基因点突变检测、基因甲基化检测项目，常见内源性干扰物质包括血红蛋白、胆红素、白细胞、血清蛋白、多糖等；常见外源性干扰物质包括维生素C、膳食纤维、消化道疾病常用药物（通便灵、西咪替丁等H2受体拮抗剂、奥美拉唑等质子泵抑制剂、硫糖铝等胃黏膜保护剂、乳酸杆菌等胃肠道益生菌、吗丁啉等促胃肠动力药、胰酶等消化酶补充剂）。

对于便隐血项目，干扰物质包括动物血红蛋白、肌红蛋白、维生素C等。

2.8便隐血检测试剂的钩状效应

采用不同浓度梯度的人血红蛋白进行检测，评价一定浓度的人血红蛋白对试剂检测结果的影响。当出现反应强度随浓度升高反而降低的情况，即为出现钩状效应的最低浓度。

2.9反应体系

2.9.1基因点突变检测、基因甲基化检测试剂的反应体系，包括核酸提取用样本体积、洗脱体积、DNA转化用核酸样本体积、DNA转化条件、反应体系中的加样量（包括采样次数及重量）、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。

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。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。

提供质控体系设置、Ct值确定的研究资料。

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。

2.9.2便隐血检测试剂的反应体系研究资料，包括加样方式、加样量（包括采样次数及重量）、反应时间、反应温度、膜孔径大小（或移行速度）（如有）等条件对产品性能的影响，通过试验确定上述条件的最佳组合。还应考虑样本加样后观察时间对产品检测结果的影响，通过试验确定最佳的观察时间。

3.稳定性研究

申报试剂的稳定性主要包括实时稳定性（有效期）、开瓶稳定性、运输稳定性及冻融次数限制（如适用）等研究，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具体的实施方案、详细的研究数据以及统计分析结论。对于实时稳定性研究，应提供至少三批产品在实际储存条件下保存至成品有效期后的研究资料。

4.阳性判断值

建议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曲线（ROC）或其他合理方法确定靶基因阳性判断值。采用临床来源的未经治疗样本，根据预期用途可纳入目标癌种、癌前病变、良性疾病、其他恶性肿瘤等样本进行阳性判断值研究，包括不同病理类型、不同分期、不同突变及甲基化比例等，同时分期进行统计。

针对筛查试剂，还应纳入无肠道相关症状的高危人群样本，同时应尽量多纳入结直肠癌I期样本和II期样本。

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。

结合便隐血联合基因点突变和/或基因甲基化检测结果，以最终病理结果为金标准，采用ROC法结合逻辑回归模型，建立计算公式。公式包含全部靶标及其对应的不同回归系数（权重）。选择约登指数最大值点或者平衡临床性能最优的灵敏度和特异性界值，从而确定试剂的阳性判断值，即为最终结果。

5.其他资料

5.1主要原材料

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、引物、探针、DNA聚合酶、UNG酶（如有）、dNTP、抗体等，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

申请人应详述点突变、甲基化基因及内标基因、引物、探针的设计原则，扩增区段，检测覆盖的突变、甲基化位点及其所在基因位置并提供选择依据，同时应提供引物、探针核酸序列及其对应的检测位点的对应关系。

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，明确研究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、热稳定性进行验证，提交功能性试验资料，并确定酶的质量标准。

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

试剂应根据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野生和突变位点样本、甲基化阴性和阳性样本、便隐血检测阴性和阳性样本。空白对照为不含靶标的溶液。核酸检测试剂对照品应参与样本核酸的平行提取。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、内标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。

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

提交企业参考品的研究资料，包括来源、组成、阴阳性和/或量值确认等。

企业参考品可采用临床样本或来源于细胞系的DNA样本。

需多靶标综合判断阴阳性的产品，应同时设置综合计算后为阳性及阴性的参考品。

基因点突变阳性参考品包括基因突变弱阳性（低突变频率）参考品、基因突变中阳性（中等突变频率）参考品和基因突变强阳性（较高的突变频率）参考品，可为一定浓度下粪便样本DNA和基因突变细胞系DNA样本的混合。

基因甲基化阳性参考品包括弱阳性（低甲基化比例）参考品、中阳性（中甲基化比例）参考品和强阳性（较高的甲基化比例）参考品，可为一定浓度下粪便背景DNA含不同比例甲基化基因的样本。

基因点突变和甲基化的检出限参考品应分别包含全部突变位点、全部甲基化基因位点，应设置检出限水平浓度的参考品。

精密度参考品可依据不同反应体系，如单独检测便隐血样本的反应体系，基因点突变和基因甲基化的反应体系，分别设置中、低浓度水平的参考品。

阴性参考品应包含易发生交叉的其他良恶性疾病样本和干扰物质。

便隐血参考品一般包括阳性参考品、阴性参考品、检出限参考品和精密度参考品，应根据产品情况进行合理设置。

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。