附件2

应用于结直肠癌辅助诊断的微小核糖核酸（microRNA）检测试剂非临床研究

审评要点

本审评要点主要针对应用于结直肠癌辅助诊断的微小核糖核酸（microRNA）检测试剂的分析性能、阳性判断值、稳定性、主要原材料和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。

本审评要点是对应用于结直肠癌辅助诊断的microRNA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。

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

本要点适用于采用实时荧光PCR法，对人粪便样本中的微小核糖核酸（microRNA）进行体外定性检测的试剂。临床用于对结直肠癌疑似患者的辅助诊断，不用于普通人群的肿瘤筛查。

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》（国家市场监督管理总局令第48号）及相关法规的要求，如微小核糖核酸（microRNA）检测试剂盒（荧光PCR法）。根据《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.其他信息还包括产品列表、关联文件、申报前与监管机构的联系情况和沟通记录以及符合性声明等文件。

（二）综述资料

综述资料主要包括概述、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。建议以图文结合的形式详细说明产品所采用的技术原理及检测流程，包括但不限于RNA提取、反转录前处理、反转录引物设计（如茎环结构等）、扩增引物探针设计原理等。如试剂盒中存在防污染体系，应进行说明。对于阳性判断值需计算后进行判读的产品，应详述计算原理、模型选择和判读规则。与已上市同类产品进行比较，比较内容包括样本类型、检测原理、检测靶基因、判读规则、分析性能和临床性能等。

预期用途中明确产品检测的基因。详述基因选择标准及选择过程，提供相关指南或文献；同时提供文献中待检基因在其他肿瘤中的表达情况，并分析所检测基因的灵敏度和特异性是否符合临床需求。

如为多靶标检测产品，应分析多靶标检测的灵敏度和特异性是否符合临床需求。

明确产品预期人群，例如年龄和体征等指标。

（三）产品技术要求及检验报告

注册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%2Bsa3vLzK9dKqxOx4NC01ri1vNSt1PKjqDIwMjLE6rXaOLrFo6kuZG9j.doc)的要求编写。该类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（包括企业参考品）以及生产工艺要求。

如有国家标准品，技术要求中应体现国家标准品的相关要求，并使用国家标准品对三批产品进行检验。

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。

（四）分析性能研究

注册申请人应采用在符合质量管理体系的环境下生产的试剂盒进行所有分析性能研究，提交具体研究方法、试验方案、试验数据、统计分析等详细资料。

如果试剂适用不同的机型，需要在不同机型上分别进行分析性能评估。应采用一个或多个机型，进行充分的试剂分析性能建立研究，对于其他机型，应分析各适用机型的工作原理、检测方法、反应条件控制、信号处理等，如基本相同，可基于风险分析对已建立的分析性能指标进行合理验证。所有适用机型验证的分析性能应基本一致，如不同机型对某一检测项目的某一分析性能存在差异，应针对该差异采用不同机型进行充分的分析性能建立研究。

如申报产品包含不同包装规格，需对各包装规格间的差异进行分析或验证。如不同规格间存在性能差异，需采用每个包装规格产品进行分析性能评估；如不同规格间不存在性能差异，需要详细说明各规格间的差别及可能产生的影响，采用具有代表性的包装规格进行分析性能评估。

分析性能评估所用样本应尽量与预期适用的真实临床样本一致。如特定低浓度的样本难以获得，可采用不同浓度的样本及阴性样本进行混合研究；必要时，如使用人工基质进行稀释，应考虑其基质效应。应提供样本基本信息，如样本来源、样本类型、稀释方式、定值过程及数据等。

建议着重对以下分析性能进行研究。

1.反应体系

1.1样本采集和处理

根据适用样本类型，进行样本采集研究。提供样本采集器具和保存液等的详细研究资料，对配套的每种保存液均需验证检出限和重复性。

1.2核酸提取、反转录和扩增反应体系

研究确定最佳核酸提取、反转录和扩增反应体系，包括核酸提取方法与过程、提取用样本体积/重量、洗脱体积、RNA浓度、DNA去除（如有）、反转录和扩增模板量、酶用量（如有）/各种试剂加样体积及反应各阶段温度、时间、循环数等。

提交不同适用机型基线和阈值循环数的确定资料。

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.样本稳定性

对采集后各阶段的样本进行稳定性研究，研究内容包括保存条件、保存时间，冻融次数等。建议对每种保存液均进行稳定性研究。

如核酸提取产物或反转录产物可不立即进行检测，还需对核酸提取产物或反转录产物的保存条件和稳定性进行研究。

3.样本适用性

产​品适用的样本类型为人粪便样本。建议根据布里斯托（Bristol）大便分类法收集主要型别的粪便样本及其他可能影响检测结果的粪便样本类型（如黏液便、胆汁便），分别进行研究。对不适用粪便类型应在说明书明示。

4.核酸提取/纯化性能

粪便样本中存在大量干扰物质。核酸提取/纯化步骤的目的除最大量分离出RNA外，还有相应的纯化作用，应尽可能去除PCR抑制物。对配合使用的所有核酸提取试剂进行提取核酸纯度、浓度、提取效率的研究。若产品适用两种或以上核酸提取试剂，则每一种核酸提取试剂均需配合检测试剂进行抗干扰、重复性和检出限的验证。

5.准确度

建议采用申报试剂与已上市产品或其他对比方法同时检测临床样本比较检测结果之间的一致性程度。研究应包括一定数量的阴性、阳性样本，并纳入不同病理分期样本和干扰样本。

6.精密度

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、试剂批次和试验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步骤。

应至少包含3个水平：阴性样本、弱阳性样本、中/强阳性样本，并根据产品特性设定适当的精密度要求，例如：

阴性样本：样本检测结果均应为阴性。

弱阳性样本：结直肠癌患者样本，待测物浓度为试剂盒阳性判断值对应的靶基因浓度，靶基因*Ct*值的CV≤5%。

中/强阳性样本：结直肠癌患者样本，待测物浓度呈中度到强阳性，阳性检出率为100%且靶基因*Ct*值的CV≤5%。

7.分析特异性

7.1交叉反应

7.1.1生物信息学分析

采用生物信息学分析方法进行研究，应当包括人基因组、粪便常见microRNA和粪便微生物组。

7.1.2 样本验证

样本基质应与预期检测样本类型一致，交叉反应研究用样本主要考虑以下几方面：

其他恶性肿瘤患者尤其是其他部位消化道恶性肿瘤患者（如食管癌、胃癌、肝癌、胰腺癌、胆管癌等）粪便样本、消化道良性疾病患者（如炎症性肠病、消化性溃疡、结直肠肠息肉等）粪便样本；

其他粪便常见microRNA、待检基因同源基因或待测靶标的相似序列microRNA。

7.2干扰研究

应根据所采集样本类型，针对可能存在的内源/外源物质干扰情况进行验证。建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度（“最差条件”）条件下进行试验，采用至少包含弱阳性水平在内的样本。对结果进行合理的统计分析，对比添加干扰物质前后的 *Ct* 值差异；如为多靶标检测产品，还应比较综合计算后的结果差异。检测的潜在干扰物包括样本中的原有物质及在样本采集和处理期间引入的物质。

常见内源性干扰物质：血红蛋白、胆红素、白细胞、血清白蛋白、多糖等。

常见外源性干扰物质：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）。

8.检出限

8.1检出限的确定

将不同来源的至少3个样本梯度稀释于与适用样本一致的基质中，进行检出限的确定。每个浓度梯度最少重复3次检测，以100%可检出的最低浓度水平作为估计检出限，在此浓度附近制备若干梯度浓度样本，每个浓度至少重复20次检测，将具有95%阳性检出率的最低浓度水平作为确定的检出限。

8.2检出限的验证

选择另外3个不同来源的样本在检出限浓度水平进行验证，应达到95%阳性检出率。

如包括多个检测靶标，应分别进行研究。

9.企业参考品验证

根据主要原材料研究资料中的企业参考品设置情况，采用三批产品对企业参考品进行检验并提供详细的试验数据。

（五）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）、使用稳定性、运输稳定性及冻融次数限制等研究，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。

（六）阳性判断值研究

单靶标检测的申报产品，阳性判断值一般为申报产品检测靶标阳性的*Ct*值。如申报产品需通过多个靶标计算后进行判读，申请人应详述计算模型选择依据、计算过程、权重系数等。

阳性判断值研究用样本来源应具有多样性和代表性，考虑不同时间、地域、不同的生理状态等因素。应根据结直肠癌辅助诊断的预期用途，纳入相关预期人群，包括不同病理分期的结直肠癌患者、不同种消化道良/恶性肿瘤疾病干扰样本，并尽量纳入较多弱阳性和高阴性水平的样本。采用ROC曲线分析建立阳性判断值，并确定产品的判读规则。如判定值存在灰区，应提供灰区的确认资料。

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、临床诊断信息、样本来源机构、检测结果等信息。

提供内标检测结果范围的确定方法和研究资料。

（七）其他非临床研究资料

1.主要原材料研究

该类产品的主要原材料包括引物、探针、酶、dNTP、核酸分离/纯化组分（如有）、质控品、企业参考品等。应提供主要原材料的选择与来源、制备过程、质量控制标准等相关研究资料、质控品的定值试验资料等。如主要原材料为企业自制，应提供其详细制备过程；如主要原材料源于外购，应提供资料包括：选择该原材料的依据及对比筛选试验资料、质量标准、出厂检验报告，以及该原材料到货后的质量检验资料。生产商应固定，不得随意更换。

1.1引物和探针：microRNA长度短、序列相似度高，在引物/反转录引物、探针设计时应充分考虑microRNA结构特点。详述靶标或靶标组合的选择过程，对于多靶标组合产品应尽可能保持彼此间的差异性，提高探针的特异性。详述引物和探针的设计原则，提供引物、探针核酸序列、靶序列的基因位点及两者的对应情况。反转录引物应结合结构图（如茎环结构），详述各部位序列、作用及反转录过程中结构变化等情况。通过筛选确定最佳的引物和探针组合。引物、探针的质量标准应至少包括序列准确性、纯度、浓度及功能性实验等。

1.2脱氧三磷酸核苷（dNTP）：包括dATP、dUTP、dGTP、dCTP和dTTP，应提供对其纯度、浓度、功能性等的详细验证资料。

1.3酶：需要的酶主要包括核糖核酸酶H（RNase H）、RNA依赖的DNA聚合酶、DNA依赖的DNA聚合酶、尿嘧啶DNA糖基化酶等，应分别对酶活性、热稳定性、功能性等进行评价和验证。

1.4质控品

试剂盒一般包含阴性质控品和阳性质控品。阳性质控品应包含试剂盒检测的靶序列。质控品需参与样本处理、核酸的平行提取和检测的全过程，以对整个提取和PCR扩增过程、试剂/设备、交叉污染等环节进行合理质量控制。提交试剂盒质控品有关原料选择、制备、定值过程、浓度范围等试验资料，对质控品的检测结果*Ct*值范围做出明确的要求。如为多靶标检测产品，还应对综合计算后的结果范围做出明确的要求。

1.5内标

内标，又称内对照，可对检验过程进行质量控制，应与靶核酸一同提取及扩增。应详述内标基因的选择。申请人需对内标的引物、探针设计和相关反应体系的浓度做精确验证，既要保证内标荧光通道呈明显的阳性曲线又要尽量降低对靶基因检测造成的抑制。明确内标的检测结果*Ct*值范围。建议科学设置内标，对待测样本的取样质量、试剂的反应体系进行监控。

1.6核酸扩增反应液（如适用）

如申请人选择包含多组分的商用核酸扩增反应液，应提交不同商用核酸扩增反应液的选择、验证研究资料，并明确核酸扩增反应液的质量标准。

1.7 其他

试剂盒中其他生物活性物质，如RNA酶抑制剂、DNA去除剂等，应分别明确其质量标准并进行验证。

1.8企业参考品制备

申请人应根据产品性能验证的实际情况自行设定企业内部参考品，包括阳性参考品、阴性参考品、检出限参考品、精密度参考品。参考品可采用临床样本、细胞系，基质一般为真实粪便样本。如特定低浓度的样本难以获得，可采用不同浓度的样本及阴性样本进行混合研究；必要时，如使用人工基质进行稀释，应考虑其基质效应。应提交企业参考品的原料来源、选择、制备、阴阳性及浓度确认方法或试剂等相关验证资料。

阳性参考品应包含不同浓度水平靶基因的结直肠癌粪便样本。

 阴性参考品应包含易发生交叉反应的其他良恶性疾病粪便样本及干扰物质、待测靶标序列相似的microRNA。

检出限参考品应包含所有靶基因检出限水平或略高于检出限的水平。

精密度参考品应选择代表性靶基因，并包括高、低两个浓度的样本，低浓度应为阳性判断值对应的靶基因浓度。

2.生产工艺研究资料

介绍产品主要生产工艺，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。