附件1：  
　　　　　　　　　　　　　　　**流行性感冒病毒核酸检测试剂注册申报资料指导原则**

**一、前言**　　本指导原则旨在指导注册申请人对流行性感冒病毒（以下简称流感病毒）核酸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对注册申报资料的技术审评提供参考。  
　　本指导原则是对流感病毒核酸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。  
　　本指导原则是对申请人和审查人员的指导性文件，但不包括注册审批所涉及的行政事项，亦不作为法规强制执行，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，相关人员应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则。  
　　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，本指导原则相关内容也将适时进行调整。

**二、适用范围**　　流感病毒核酸检测试剂是指利用荧光探针聚合酶链式反应（PCR）或其他类分子生物学方法，以特定的流感病毒基因序列为检测目标，对人咽拭子、呼吸道洗液、抽吸液或其他呼吸道分泌物样本中的流感病毒进行体外定性检测的试剂。  
　　本指导原则适用于进行首次注册申报和相关许可事项变更的产品。

**三、注册申报资料要求**　　（一）综述资料  
　　流感病毒包括甲、乙、丙三型，甲型最容易引起流行，乙型次之，丙型极少引起流行。依据病毒颗粒外膜血凝素（HA）和神经氨酸酶（NA）蛋白抗原性的不同，甲型流感病毒目前可分为16个H亚型（H1-H16）和9个N亚型（N1-N9），目前已有H1、H2、H3、H5、H7和H9等亚型有人感染的报道。由于编码HA和（或）NA的核苷酸序列容易发生突变，致使HA和（或）NA的抗原表位发生改变，这种抗原性的改变使人群原有的特异性免疫力失效，故甲型流感病毒常引起较大规模甚至世界性的流感流行。按照流行特点，造成人间流感流行的流感病毒可区分为季节性流感病毒和新型甲型流感病毒。季节性流感病毒通常在年度间发生小范围的基因变异，这种基因变异会导致微小的抗原性改变，称为抗原漂移（antigenic drift）。因此，季节性流感病毒虽具有年度特异性且抗原性的改变使感染者不易获得持久免疫力，但传播范围通常局限于较小的人群范围，一般不会造成太高的发病率和死亡率，易感人群多为老年人（>65岁）和婴幼儿（<6岁）。在过去的几十年中，季节性流感病毒主要集中在甲型H3N2和H1N1亚型。近年来，新型甲型流感病毒亚型暴发流行的案例时有发生。例如，2009年新型甲型H1N1流感病毒造成全球性流感大流行；人感染高致病性禽流感（H5亚型）病毒的病例时有报道，禽类甲型H5N1亚型流感病毒被认为具有造成人间大范围流感流行的潜力。新型甲型流感病毒通常由于基因的节段性重组所致，这种大范围的基因改变易导致病毒抗原特性的重大改变，称为抗原转变（antigenic shift）。新型甲型H1N1流感病毒（2009）即同时包含了禽流感、猪流感和人季节性流感的基因片段从而导致病毒在抗原水平发生了明显改变。由于抗原性的明显改变以及可能由此造成的病毒毒力的增强，病毒的传染性和致病严重程度都有所增加，故新型甲型流感病毒可能造成更高的发病率和死亡率。  
　　流感病毒主要经空气飞沫传播，常引起发热、乏力、肌肉酸痛以及轻到中度的呼吸道症状，重者可致肺炎、心肌炎和心衰。流感病毒核酸检测试剂可用于流感的辅助诊断，甲型流感病毒各亚型检测试剂还可用于区分季节性流感病毒和新型甲型流感病毒，并可获得关于流感暴发的流行病学信息。  
　　用于流感病毒检测的样本采集无法标准化，且具有一定的随意性，利用核酸定量检测的方法对流感病人进行病情监测或疗效观察，并无合理的临床指导意义，甚至可能导致错误的医学解释，误导用药量的增减或其他诊疗措施，因此，不建议企业研发流感病毒核酸的定量检测试剂。  
　　在注册申报资料中，流感病毒的命名应采用世界卫生组织关于流感病毒毒株命名的相关要求进行。流感病毒毒株命名包括6个要素：型别/宿主/分离地区/毒株序号/分离年份（Hn和Nn），H和N分别代表血凝素和神经氨酸酶，n是阿拉伯数字，对于人流感病毒可以省略宿主信息。如名为“A/Shanghai/37T/2009（H1N1）”的病毒株代表2009年在上海分离的以人为宿主的甲型H1N1亚型流感病毒，毒株序号为37T。  
　　综述资料主要包括产品预期用途、产品描述、有关生物安全性的说明、研究结果的总结评价以及同类产品上市情况介绍等内容，其中同类产品上市情况介绍部分应着重从方法学及不同类型毒株检出能力等方面写明拟申报产品与目前市场上已获批准的同类产品之间的主要区别。应符合《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》（以下简称《办法》）和《体外诊断试剂注册申报资料基本要求》（国食药监械〔2007〕609号）的相关要求。  
二）产品说明书  
　　说明书承载了产品预期用途、标本采集及处理、实验方法、检测结果解释以及注意事项等重要信息，是指导实验室工作人员正确操作、临床医生针对检验结果给出合理医学解释的重要依据，因此，产品说明书是体外诊断试剂注册申报最重要的文件之一。产品说明书的格式应符合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，境外试剂的中文说明书除格式要求外，其内容应尽量保持与原文说明书的一致性，翻译力求准确且符合中文表达习惯。产品说明书的所有内容均应与申请人提交的注册申报资料中的相关研究结果保持一致，如某些内容引用自参考文献，则应以规范格式对此内容进行标注，并单独列明文献的相关信息。  
　　结合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，下面对流感病毒核酸检测试剂说明书的重点内容进行详细说明，以指导注册申报人员更合理地完成说明书编制。  
　　1.【预期用途】  应至少包括以下几部分内容：  
　　（1）试剂盒用于定性检测人鼻咽拭子、口咽拭子、呼吸道抽吸液、洗液和/或其他呼吸道分泌物样本的流感病毒核酸，适用样本类型应结合实际的临床研究完成情况进行确认。  
　　（2）简单介绍待测目标的特征，如病毒种系渊源、生物学性状、宿主特性、致病性、感染后临床表现、待测靶基因特征等。  
　　（3）待测人群特征介绍：具有流感样症状的患者、相关的密切接触者、地域要求或年龄限制（如有）等。  
　　（4）强调：实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防备设施及防护程序。  
　　2.【主要组成成份】  
　　（1）说明试剂盒包含组分的名称、数量、比例或浓度等信息，阴性/阳性对照品（或质控品）可能含有人源组分，应提供其生物学来源、活性及其他特性；不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。  
　　（2）试剂盒中不包含但对该项检测必须的组分，企业应列出相关试剂/耗材的名称、货号及其他相关信息。  
　　（3）如果试剂盒中不包含用于核酸分离/纯化的试剂组分，则应在此注明经验证后推荐配合使用的商品化核酸分离/纯化试剂盒的生产企业、产品名称以及产品货号等详细信息。  
　　3.【储存条件及有效期】  
　　试剂盒的效期稳定性、开封稳定性、复融稳定性、运输稳定性、冻融次数要求等。  
　　4.【样本要求】  重点明确以下内容：  
　　（1）样本采集时间点的选择：是否受临床症状、用药情况等因素的影响。  
　　（2）对采样拭子、容器及保存液的要求：对采样拭子的材质要求（包括对拭子头和拭子杆的要求）、保存容器、转运保存液的要求、转运条件等。  
　　（3）样本采集：具体采集部位及类型，详述具体的操作方法或列出相关操作指南文件以指导使用者（最好能够给出具体图示），尽量减少由于样本采集或处理不当对实验造成的影响。  
　　（4）样本处理及保存：核酸提取前的预处理、保存条件及期限（短期、长期）、运输条件等。冷藏/冷冻样本检测前是否须恢复室温，冻融次数限制。  
　　5.【适用机型】所有适用的仪器型号，并提供与仪器有关的重要信息以指导用户操作。  
　　6.【检验方法】  详细说明实验操作的各个步骤，包括：  
　　（1）实验条件：实验室分区、实验环境的温度、湿度、空调气流方向控制等注意事项。  
　　（2）试剂配制方法、注意事项。  
　　（3）详述待测样本及相关对照品（质控品）核酸提取的条件、步骤及注意事项。  
　　（4）核酸提取方法的详细介绍。  
　　（5）扩增反应前准备：加样体积、顺序等。  
　　（6）RT-PCR各阶段的温度、时间设置、循环数设置及相关注意事项。  
　　（7）仪器设置：特殊参数、结合探针的荧光素标记情况对待测基因及内标的荧光通道选择。  
　　（8）基线、循环阈值（Ct值）的选择方法。  
　　7.【检验结果的解释】  
　　结合阳性对照、阴性对照、内对照（内标）以及样本管靶基因检测结果的Ct值，以列表的形式对所有可能出现的结果组合及相应的解释进行详述。如存在检测灰区，应对灰区结果的处理方式一并详述。另外，如果PCR体系中包含了两个或以上的荧光探针对靶基因序列进行检测，则在结果解释时，应对每个探针所对应荧光通道的Ct值的结果及可能产生的结果组合均进行合理解释。说明对何种条件下需要进行重复检测以及在重复检测时对待测样本可能采取的优化条件等进行详述。  
　　8.【检验方法局限性】  
　　（1）本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。  
　　（2）有关假阴性结果的可能性分析  
　　①不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。  
　　②流感病毒待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。  
　　③对于突发的新型甲型流感病毒，其检测的最适样本类型及感染后的最佳采样时间可能尚未确认，因此，在同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。  
　　④未经验证的其他干扰或PCR抑制因子，如……等可能会导致假阴性结果（如有）。  
　　9.【产品性能指标】 详述以下性能指标：  
　　（1）对相应国家参考品（如有）检测的符合情况。对于甲型流感通用型核酸检测试剂，应列出所有验证过的甲型各亚型病毒株的信息。  
　　（2）最低检测限（分析灵敏度）：说明试剂的最低检出浓度，建议采用生物学方式表示病毒滴度，如半数组织培养感染量（TCID50）或空斑形成单位（PFU）的形式，简单介绍最低检测限的确定方法以及对最低检测限验证所采用的病毒株信息。  
　　（3）企业内部阳性/阴性参考品符合率，简单介绍阳性参考品的来源、浓度梯度、阴性参考品组成、来源以及浓度梯度设置等信息。  
　　（4）精密度：精密度参考品的组分、浓度及评价标准。  
　　（5）分析特异性  
　　①甲型流感病毒各亚型间的交叉反应验证：针对甲型流感病毒亚型检测的试剂盒，则应对较常见的除目的基因外的其他亚型进行交叉反应验证并对结果进行合理分析；  
　　②交叉反应：易产生交叉反应的其他病原体核酸的验证情况，建议以列表的方式表示经过交叉反应验证的病原体名称、型别、浓度等信息；  
　　③干扰物质：样本中常见干扰物质对检测结果的影响，如血液、粘蛋白、脓液等；  
　　④药物影响：治疗感冒或其他呼吸道症状患者外用或内服的常见药物对检测结果的影响，如常见抗感冒药物、糖皮质激素、抗生素、中药等。  
　　（6）对比试验研究（如有）：简要介绍参比试剂（方法）的信息、所采用的统计学方法及统计分析结果。  
　　10.【注意事项】应至少包括以下内容：  
　　（1）有关人源组分（如有）的警告，如：试剂盒内对照品（质控品）或其他可能含有人源物质的组分，虽已经通过了HBs-Ag、HIV1/2-Ab、HCV-Ab等项目的检测，但截至目前，没有任何一项检测可以确保绝对安全，故仍应将这些组分作为潜在传染源对待。  
　　（2）实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。实验人员必须进行专业培训；实验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染；实验用消耗品（如离心管、吸头等）应有合理的清洁和质检程序，避免RNA酶污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。  
三）拟定产品标准及编制说明  
　　拟定产品标准应符合《办法》和《体外诊断试剂注册申报资料基本要求》的相关规定。另外，对于国产试剂，应参考《中国生物制品规程》（2000年版），将拟申报产品的主要原材料、生产工艺及半成品检定等内容作为附录附于标准正文后，并在正文的“产品分类”项中引出该附录内容。附录中应将待测靶基因的基因位点、全序列，引物/探针序列、来源及验证情况，各种酶的来源、特性以及验证等重点内容予以明确。  
　　流感病毒核酸检测试剂的注册检测应主要包括以下性能指标：物理性状、试剂盒内阴性/阳性对照品（质控品）的Ct值要求（包括内标）、阳性/阴性参考品符合率、精密度、最低检测限（分析灵敏度）等。阳性参考品主要考察对不同来源的病毒株、不同滴度的检测符合性，对于甲型流感病毒核酸通用型检测试剂，在此还应考虑不同亚型的覆盖检测能力。阴性参考品则是对分析特异性（交叉反应）的验证，应主要包括易发生交叉反应的其他病原体的假阳性情况的考核。  
　　如果拟申报试剂已有相应的国家/行业标准发布，则企业标准的要求不得低于上述标准要求。  
　　（四）注册检测  
　　根据《办法》要求，首次申请注册的第三类产品应该在国家食品药品监督管理局认可的、具有相应承检范围的医疗器械检测机构进行连续3个生产批次样品的注册检测。对于已经有国家标准品的流感病毒项目，在注册检测时应采用相应的国家标准品进行,对于目前尚无国家标准品的项目，生产企业应建立自己的参考品体系并提供相应的内部参考品。  
　　（五）主要原材料研究资料  
　　应提供主要原材料如引物、探针、企业参考品或标准品的选择与来源、制备过程、质量分析和质控标准等的相关研究资料。若主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定；如主要原材料购自其他供货商，应提供的资料包括：对物料供应商审核的相关资料、供货方提供的质量标准、出厂检定报告，以及该原材料到货后的质量检验资料。  
　　1.核酸分离/纯化组分（如有）的主要组成、原理介绍及相关的验证资料。  
　　2.RT-PCR组分的主要材料（包括引物、探针、各种酶及其他主要原料）的选择、制备、质量标准及实验研究资料，主要包括以下内容：  
　　（1）脱氧三磷酸核苷（dNTP）  
　　核酸的组成成分，包括：dATP、dUTP、dGTP、dCTP和dTTP，对纯度、浓度、保存稳定性等验证资料。  
　　（2）引物  
　　由一定数量的dNTP构成的特定序列，通常采用DNA合成仪人工合成，合成后经聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）或其他适宜方法纯化。需提供对序列准确性、纯度、稳定性、功能性实验等验证资料。如为外购，应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如PAGE电泳结果或高效液相色谱法（HPLC）分析图谱。  
　　（3）探针  
　　特定的带有示踪物（标记物）的已知核酸片段（寡聚核苷酸片段），能与互补核酸序列退火杂交，用于特定核酸序列的探测。合成后经聚丙烯酰胺凝胶电泳或其他适宜方法纯化，在5-端(和/或3-端)进行标记，并经HPLC或其他适宜方法纯化。纯度应达到HPLC纯，应提供合成机构出具的合成产物的质检证明。  
　　（4）PCR反应所需酶  
　　DNA聚合酶，应具有DNA聚合酶活性，无核酸内切酶活性，具热稳定性，如：94℃保温1小时后仍保持50%活性；尿嘧啶糖基化酶（UNG），具有尿嘧啶糖基化活性，无核酸外切酶及核酸内切酶活性，应对酶活性有合理验证；逆转录酶，具逆转录酶活性，无核酸内切酶活性。应提供有关保存稳定性、活性及功能实验等的验证资料。  
　　3.对照品（质控品）的原料选择、制备、定值过程及试验资料。  
　　4.核酸类检测试剂的包装材料和耗材应无DNase和RNase污染。  
　　（六）主要生产工艺及反应体系的研究资料  
　　基本生产工艺主要包括：配制工作液、半成品检定、分装和包装。配制工作液的各种原材料及其配比应符合要求，原材料应混合均匀，配制过程应对pH、电导率等关键参数进行有效控制。  
　　生产工艺研究资料应能对反应体系涉及到的基本内容，如临床样本用量、试剂用量、反应条件、质控体系设置、Ct（临界）值确定等，提供确切的依据，主要包括以下内容：  
　　1.主要生产工艺介绍，可以图表方式表示。  
　　2.反应原理介绍。  
　　3.基因位点选择、RT-PCR方法学特性介绍。  
　　4.确定最佳RT-PCR反应体系的研究资料，包括酶浓度、引物/探针浓度、dNTP浓度、阳离子浓度等。  
　　5.确定RT-PCR反应各阶段温度、时间及循环数的研究资料。  
　　6.对于基线阈值（threshold）和阈值循环数（Ct）确定的研究资料。  
　　7.不同适用机型的反应条件如果有差异应分别详述。  
　　另外，对于试剂盒的对照（质控）品设置，建议企业参考以下要求执行：  
　　（1）流感病毒核酸检测试剂盒的外部对照（质控）品应至少设置临界阳性对照（质控）品和阴性对照（质控）品，均应参与样本核酸的平行提取，以对核酸提取、RT-PCR反应过程、试剂/设备、交叉污染等环节进行合理质量控制，企业应对各种对照（质控）品的Ct值做出明确的范围要求。注意，建议采用与实际检测样本具有相同或相似性状的基质溶液作为阴性对照（质控）品，不推荐采用水作为阴性对照（质控）品。  
　　（2）样本反应管应设置合理的内对照（内标）以对管内抑制可能造成的假阴性结果进行质控。申请人应对内标的引物、探针和模板的浓度做精确验证，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竞争性抑制而导致假阴性。对内标的Ct值也应有明确的范围要求。  
　　（3）关于对照品的原料选择：内对照（内标）应采用具有蛋白外壳的病毒颗粒，如灭活的流感病毒或缺陷病毒（假病毒）等，外部阳性对照可以采用灭活病毒、假病毒或质粒。  
（七）分析性能评估资料  
　　企业应提交原厂在产品研制阶段对试剂盒进行的所有性能验证的研究资料，包括具体研究方法、内控标准、实验数据、统计分析等详细资料。对于流感病毒核酸类定性检测试剂，建议着重对以下分析性能进行研究。  
　　1.流感病毒核酸（RNA）提取  
　　病毒RNA提取主要有以下目的：富集靶核酸浓度、保证靶核酸序列的完整性、增加PCR模板溶液均一性、去除PCR抑制物，是决定RT-PCR成败的要素之一。RNA极易受RNA酶（RNase）的降解，而临床标本和实验室环境中存在大量的RNase，因此，无论申报产品是否含有RNA分离/纯化的组分，企业都应对核酸提取的环节做充分的验证。除最大量分离出目的RNA外，还应有相应的纯化步骤，尽可能去除PCR抑制物。传统的RNA分离纯化方法（如表面活性剂加蛋白酶结合氯仿-酚抽提法）和改良方法（如硅磁性微粒吸附法）均有或多或少的优势和不足，申请人应结合申报产品的特性，合理选择RNA分离/纯化试剂，并提供详细的验证资料。  
　　2.最低检测限（分析灵敏度）  
　　（1）最低检测限的确定  
　　建议使用培养后病毒原液的梯度稀释液进行最低检测限确定，每个梯度的病毒稀释液重复3～5份，每份进行不少于20次的重复检测，将具有90%～95%阳性检出率的病毒水平作为最低检测限。通过另制备至少5份最低检测限浓度水平的病毒稀释液对90%～95%的检出率进行确认。建议采用半数组织培养感染量(50% tissue culture infectious dose，TCID50）、空斑形成单位（plaque forming units，PFU）法或copies/ml的方式进行病毒浓度确认，并采用上述方式作为病毒浓度的表示方式。在进行最低检测限的确认时，参与研究的甲型流感病毒各亚型和乙型流感病毒应至少包括不同来源的两个具有代表性的病毒株的系列稀释梯度。  
　　（2）最低检测限的验证  
　　申报试剂应在最低检测限或接近最低检测限的病毒浓度对每种常见待测流感病毒亚型具有时间和区域特征性的至少3个病毒株进行验证。对此，企业应能够提供用于最低检测限验证的各个病毒株的来源、型别确认及滴度确认试验等信息。用于最低检测限确定和验证的病毒株如包括疫苗株，则其应能够体现最近流感发病季的病毒特点。  
　　3.分析特异性  
　　（1）交叉反应  
　　①用于流感病毒核酸检测试剂交叉反应验证的病原体种类主要考虑以下几方面可能性：核酸序列具有同源性、易引起相同或相似的临床症状、采样部位正常寄生或易并发的其他微生物。  
　　②建议在病毒和细菌感染的医学相关水平进行交叉反应的验证。通常，细菌感染的水平为106 cfu/ml或更高，病毒为105 pfu/ml或更高。  
　　③首先，应在流感病毒不同型别和亚型间进行交叉反应验证；其次，采用其他的病原微生物进行验证（见表1）。  
　　④申请人应提供所有用于交叉反应验证的病毒和细菌的来源、种属/型别和浓度确认等试验资料。有关交叉反应验证的信息应以列表的方式在产品说明书的【产品性能指标】项中有所体现。  
　　　　　　　　　　　　　　**表1　建议用于交叉反应性研究的微生物**

|  |  |
| --- | --- |
| **微生物** | **类型** |
| 腺病毒 | 3型 |
| 腺病毒 | 7型 |
| 人冠状病毒 |  |
| 巨细胞病毒 |  |
| 肠道病毒 |  |
| 人副流感病毒 | 1、2、3型 |
| 麻疹病毒 |  |
| 人偏肺病毒 |  |
| 流行性腮腺炎病毒 |  |
| 呼吸道合胞病毒 | B型 |
| 鼻病毒 | 1A型 |
| 百日咳杆菌 |  |
| 肺炎衣原体 |  |
| 棒状杆菌\* |  |
| 大肠杆菌\* |  |
| 流感嗜血杆菌 |  |
| 乳杆菌\* |  |
| 卡他莫拉菌\* |  |
| 无毒结核分枝杆菌 |  |
| 肺炎支原体 |  |
| 脑膜炎奈瑟菌 |  |
| 淋球菌\* |  |
| 铜绿假单胞菌\* |  |
| 金黄色葡萄球菌 |  |
| 表皮葡萄球菌\* |  |
| 肺炎链球菌 |  |
| 化脓链球菌 |  |
| 唾液链球菌 |  |

　　　　　　　　　\*项：选择性验证。

　　（2）干扰物质  
　　①潜在的干扰物质主要包括：血液、鼻分泌物或粘液、用于缓解鼻塞和咽部充血、鼻腔干燥、刺激、哮喘和过敏症状的药物（见表2）。  
　　②使用医学相关水平的干扰物浓度进行验证，另外，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。  
　　③申请人应采用每种流感病毒亚型的至少两种病毒株对呼吸道样本中物质的潜在抑制影响进行评估，建议在每种流感病毒的检测临界值水平对每种干扰物质的干扰影响进行检测。  
　　　　　　　　　　　　　　　　**表2　建议用于干扰研究的物质**

|  |  |
| --- | --- |
| **物质** | **活性成分举例** |
| 粘蛋白 | 纯化粘蛋白 |
| 人血液 |  |
| 鼻腔喷雾剂或滴鼻剂 | 肾上腺素、羟甲唑啉、含防腐剂的氯化钠溶液 |
| 鼻腔糖皮质激素 | 倍氯米松、地塞米松、氟尼缩松、曲安西龙、布地奈德、莫美他松、氟替卡松 |
| 鼻用凝胶 | 硫磺 |
| 过敏性症状缓解药物 | 金英 |
| 润喉片、口服麻醉剂和镇痛剂 | 苯唑卡因、薄荷脑 |
| 抗病毒药物 | 扎那米韦 |
| 抗生素、鼻用软膏 | 莫匹罗星 |
| 全身抗菌药妥布霉素 |  |

4.精密度  
　　测量精密度的评价方法并无统一的标准可依，可根据不同产品特征或企业的研究习惯进行，前提是必须保证研究的科学合理性。具体实验方法可以参考相关的CLSI-EP文件或国内有关体外诊断产品性能评估的文件进行。企业应对每项精密度指标的评价标准做出合理要求，如标准差或变异系数的范围等。针对本类产品的精密度评价主要包括以下要求。  
　　（1）对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除申报试剂（包括提取组分和RT-PCR组分）本身的影响外，还应对PCR分析仪、操作者、地点等要素进行相关的验证。  
　　（2）合理的精密度评价周期，例如：为期至少20天的连续检测，每天至少由2人完成不少于2次的完整检测，从而对批内/批间、日内/日间以及不同操作者之间的精密度进行综合评价。如有条件，申请人应选择不同的实验室进行重复实验以对室间精密度进行评价。  
　　（3）用于精密度评价的质控品应至少包括3个水平:  
　　①阴性质控品：待测物浓度低于最低检测限或为零浓度，阴性检出率应为100%（n≥20）。  
　　②临界阳性质控品：待测物浓度略高于试剂盒的最低检测限，阳性检出率应高于95%（n≥20）。  
　　③阳性质控品：待测物浓度呈中度到强阳性，阳性检出率为100%且CV≤10%（n≥20）。  
　　另外，建议申请人选择适量临床采集的新鲜病人样本（包括所有样本类型）作为无靶值质控品进行精密度评价，以更好地模仿临床检测环境。  
　　5.阳性/阴性参考品  
　　如申报产品有相应的国家参考品，则企业内部阳性/阴性参考品应参考国家参考品的项目设置。在不低于国家参考品要求的前提下，申请人可以结合实际情况设置合理的企业内部阳性/阴性参考品。对于没有国家参考品的产品，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，阳性参考品应着重考虑病毒型别、亚型及滴度要求，阴性参考品则主要涉及对分析特异性（交叉反应）的验证情况。  
　　申请人应对内部阳性/阴性参考品的来源、型别鉴定、病毒滴度等信息进行精确的实验验证，并提交详细的验证资料。  
　　6.其他需注意问题  
　　对于适用多个机型的产品，应提供如产品说明书【适用机型】项中所列的所有型号仪器的性能评估资料。  
　　（八）参考值（参考范围）确定资料  
　　对于此类试剂，参考值确定资料主要是指Ct值的确认资料，建议申请人采用受试者工作特征（ROC）曲线的方式对申报产品用于结果判断的临界值予以确认。  
　　（九）稳定性研究资料  
　　稳定性研究资料主要涉及两部分内容，申报试剂的稳定性和适用样本的稳定性研究。前者主要包括实时稳定性（有效期）、运输稳定性、开瓶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。对于实时稳定性研究，应提供至少三批样品在实际储存条件下保存至成品有效期后的研究资料。  
　　考虑到病毒RNA极易被降解的特性，企业也应对样本稳定性进行研究，主要包括冷藏和冷冻两种条件下的有效期验证，可以在合理的温度范围内选择3～5个温度点（应至少包括范围的上限和下限温度），每间隔一定的时间段即对储存样本进行全性能的分析验证，从而确认不同类型样本的效期稳定性。在对样本进行效期稳定性的评价时，同时应对推荐使用的采样拭子、样本保存液及保存容器进行合理验证。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。  
　　试剂稳定性和样本稳定性两部分内容的研究结果均应在说明书【储存条件及有效期】和【样本要求】两项中进行详细说明。  
　　（十）临床试验研究  
　　1.研究方法  
　　对于已有同类产品上市的试剂的临床研究，选择境内已批准上市、临床普遍认为质量较好的同类产品作为参比试剂，采用拟申报产品（以下称考核试剂）与之进行对比试验研究，证明本品与已上市产品等效或优于已上市产品。另外，申请人还应选择一定数量的新鲜采集样本进行考核试剂与流感病毒检测的“金标准”方法—病毒分离培养鉴定方法的比较研究，每种样本类型不少于30例经病毒分离培养方法确定为阳性的样本。  
　　对于无法选择参比试剂的新型流感病毒核酸检测试剂，其临床研究应选择病毒分离培养鉴定和/或病毒核酸序列测定方法作为参比方法，总例数不少于500例。用于核酸序列测定的引物序列应不同于考核试剂中用于检测目的基因的引物序列。  
　　另外，对于已被批准上市的甲型流感病毒核酸（通用型）检测试剂，如果在其注册证有效期内出现了新型甲型流感病毒的暴发流行，如有需要，生产企业应迅速针对新的流感亚型开展临床比对研究，可以采用病毒检测的“金标准”方法或当时卫生行政部门认可的针对该新型甲型流感病毒亚型的诊断标准作为参比方法进行临床比对研究，分别对采集自新型甲型流感病毒感染（阳性病例不少于30例）、其他常见的流感病毒亚型（如当年流行的季节性甲型流感病毒）以及非流感病毒感染但具有流感样症状的患者的新鲜样本进行比对实验研究，总例数不少于100例，如临床试验研究结果可以证明其对新型甲型流感病毒亚型的检测能力，申请人在重新注册时应考虑到因病毒株变化而导致预期用途发生实际改变的因素，同时提出变更申请，并按相关法规要求提交分析性能评估和临床试验研究等资料。  
　　2.临床研究单位的选择  
　　考虑到流感病毒不同病毒株的区域性特征较强，故建议申请人在国内不同区域选择临床单位，尽量使各单位的临床样本有一定的区域代表性；临床研究单位应具有呼吸道疾患诊疗和分子生物学方法检测的优势，实验操作人员应有足够的时间熟悉检测系统的各环节（仪器、试剂、质控及操作程序等），熟悉评价方案。在整个实验中，考核试剂和参比方法都应处于有效的质量控制下，最大限度保证试验数据的准确性及可重复性。  
　　3.临床试验方案  
　　临床试验实施前，研究人员应从流行病学、统计学、临床医学、检验医学等多方面考虑，设计科学合理的临床研究方案。各临床研究机构的方案设置应基本一致，且保证在整个临床试验过程中遵循预定的方案实施，不可随意改动。整个试验过程应在临床研究机构的实验室内并由本实验室的技术人员操作完成，申报单位的技术人员除进行必要的技术指导外，不得随意干涉实验进程，尤其是数据收集过程。  
　　试验方案中应确定严格的病例纳入/排除标准，任何已经入选的病例再被排除出临床研究都应记录在案并明确说明原因。在试验操作过程中和判定试验结果时应采用盲法以保证试验结果的客观性。各研究单位选用的参比试剂及所用机型应完全一致，以便进行合理的统计学分析。另外，考核试剂的样本类型不应超越参比试剂对样本类型的检测要求，如果选择了参比试剂适用样本类型以外的样本，则应选择病毒分离培养鉴定或其他合理方法对额外的样本类型进行验证。  
4.病例选择及样本类型  
　　临床试验应选择具有流感症状/体征(例如：咳嗽、鼻塞、鼻漏、咽喉疼痛、发烧、头疼、肌痛)、流感相似症状或有密切接触史的人群作为研究对象。患者流感症状出现后，流感病毒在鼻腔或气管分泌物中的浓度在24～48小时内将保持较高水平，但在不同年龄段人群可能有一定差异，在儿童体内的持续时间更长。申请人在建立病例纳入标准时，应考虑到各年龄段人群的差异，尽量覆盖各个年龄段人群。在进行结果统计分析时，除总体病例数的要求外，建议对各年龄段人群分层进行数据统计分析 。  
　　对于新型甲型流感病毒亚型核酸检测试剂，如新型甲型流感病毒（2009流行株）、高致病性禽流感病毒H5亚型等，其临床研究所选择病例除新型甲型流感病毒感染者及密切接触者外，还应包括其他当年流行的季节性流感病毒感染患者、非流感病毒感染但具有流感样症状的患者等。其临床研究应能够体现该产品对新型甲型流感病毒核酸检测的特异性。  
　　临床试验中所涉及的样本类型应为实际临床检测中常用的样本类型。通常，我们建议对于每种样本类型应有不少于100例的阳性病例，对于阴性病例的选择，也应考虑到交叉反应的需要，以从临床角度考察其分析特异性。  
　　5.统计学分析  
　　对临床试验结果的统计应选择合适的统计方法，如检测结果一致性分析、受试者工作特征（ROC）曲线分析、阴性/阳性符合率等。对于本类产品对比实验的等效性研究，常选择交叉四格表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行四格表卡方或kappa检验以验证两种试剂定性结果的一致性，统计分析应可以证明两种方法的检测结果无明显统计学差异。在临床研究方案中应明确统计检验假设，即评价考核试剂与参比试剂是否等效的标准。  
　　6.结果差异样本的验证  
　　在数据收集过程中，对于两种试剂检测结果不一致的样本，应采用“金标准”方法或临床上普遍认为质量较好的第三种同类试剂进行复核，同时结合患者的临床病情对差异原因及可能结果进行分析。  
　　7.临床试验总结报告撰写  
　　根据《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求，临床试验报告应该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，并应包括必要的基础数据和统计分析方法。建议在临床总结报告中对以下内容进行详述。  
　　（1）临床试验总体设计及方案描述  
　　①临床试验的整体管理情况、临床研究单位选择、临床主要研究人员简介等基本情况介绍。  
　　②病例纳入/排除标准、不同年龄段人群的预期选择例数及标准。  
　　③样本类型，样本的收集、处理及保存等。  
　　④统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。  
　　（2）具体的临床试验情况  
　　①申报试剂和参比试剂的名称、批号、有效期及所用机型等信息。  
　　②对各研究单位的病例数、年龄分布情况进行总合，建议以列表或图示方式给出具体例数及百分比。  
　　③质量控制，试验人员培训、仪器日常维护、质控品运行情况，对检测精密度、质控品测量值的抽查结果评估。  
　　④具体试验过程，样本检测、数据收集、样本长期保存、结果不一致样本的校验等。  
　　（3）统计学分析  
　　①数据预处理、差异数据的重新检测或第三方验证以及是否纳入最终数据统计、对异常值或缺失值的处理、研究过程中是否涉及对方案的修改。  
　　②阳性符合率、阴性符合率、总体符合率及其95%（或99%）的置信区间。  
　　③以交叉表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行四格表卡方或kappa检验以验证两种试剂定性结果的一致性。  
　　另外考虑到对不同样本类型以及不同年龄段人群的检测结果可能存在一定差异，故建议对不同样本类型及不同年龄段人群分别进行统计分析，以对考核试剂的临床性能进行综合分析。  
　　（4）讨论和结论  
　　对总体结果进行总结性描述并简要分析试验结果，对本次临床研究有无特别说明，最后得出临床试验结论。  
  
　　**四、名词解释**　　1.分析特异性（Analytical Specificity）：测量程序只测量被测量物的能力。分析特异性用于描述检测程序在样本中有其他物质存在时只测量被测量物的能力。通常以一个被评估的潜在干扰物清单来描述，并给出在特定医学相关浓度值水平的分析干扰程度。   
　　注：潜在干扰物包括干扰物和交叉反应物。   
　　2.精密度（Precision）：在规定条件下，相互独立的测试结果之间的一致程度。精密度的程度是用统计学方法得到的测量不精密度的数字形式表示，如标准差（SD）和变异系数（CV）。  
  
　　**五、参考文献：**　　1.《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》，（国食药监械〔2007〕229号），2007年4月19日  
　　2.《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》，（国食药监械〔2007〕240号），2007年4月28日  
　　3.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》，（国食药监械〔2007〕240号），2007年4月28日  
　　4.Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection or Detection and Differentiation of Influenza Viruses, CDRH, FDA, USA, February 15, 2008  
　　5.彭文伟，《传染病学》，第五版，人民卫生出版社，2001。  
　　6.李金明，《实时荧光PCR技术》，第一版，人民军医出版社，2007  
　　7.Robert F. Weaver， Molecular Biology，4th Edition，2008。  
　　8.刘艳芳、张勇建、苏明，临床病毒学检验，军事医学科学出版社，2009。  
　　9.Molecular Diagnostic Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline—Second Edition. Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS), MM3-A2, Vol26 No.8, ISBN 1-56238-596-8.  
　　10.Quantitative Molecular Methods for Infectious Diseases; Approved Guideline. NCCLS, MM6-A, Vol. 23 No.28. ISBN 1-56238-508-9.  
　　11.Verification and Validation of Multiplex Nucleic Acid Assays; Approved Guideline. Clinical and Laboratory Standards Institute (Formerly NCCLS), MM17-A, Vol.28 No.9, ISBN 1-56238-661-1.  
　　12.冯仁丰，《临床检验质量管理技术基础》，第二版，上海科学技术文献出版社，2007年4月。  
　　13.《中国生物制品规程》（2000年版），化学工业出版社