**指导原则编号**

**弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒抗体及IgG抗体亲合力检测试剂技术审查指导原则**

**（第二次征求意见稿）**

**二O一三年十一月**

**目录**

[一、前言 3](#_Toc323285326)

[二、范围 4](#_Toc323285327)

[三、注册申报资料要求 6](#_Toc323285328)

[（一）综述资料 6](#_Toc323285329)

[（二）产品说明书 7](#_Toc323285330)

[（三）拟定产品标准及编制说明 1](#_Toc323285331)7

[（四）注册检测 1](#_Toc323285332)7

[（五）主要原材料研究资料 1](#_Toc323285333)8

[（六）主要生产工艺及反应体系的研究资料 2](#_Toc323285334)0

[（七）分析性能评估资料 2](#_Toc323285335)1

[（八）参考值（范围）确定资料 2](#_Toc323285336)7

[（九）稳定性研究资料](#_Toc323285337) 28

[（十）临床试验资料](#_Toc323285338) 29

[四、](#_Toc323285339)[参考文献 3](#_Toc323285340)6

弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒抗体及IgG抗体亲合力检测试剂

技术审查指导原则

# 一、前言

本指导原则旨在指导注册申请人对弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒抗体及IgG抗体亲合力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。

本指导原则是对弓形虫、风疹病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒抗体及IgG抗体亲合力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、范围

弓形虫( Toxoplasma, TOXO ) 、风疹病毒( Rubella virus , RV) 、巨细胞病毒(Cytomegalovirus , CMV) 及单纯疱疹病毒 (herpes simplex virus, HSV) 四种病原体，以缩写形式ToRCH命名。上述四种病原体已引起围产医学家和优生优育学家的关注，如何应用应基于大量的研究及相关学科的诊疗指南。

依免疫球蛋白(immunoglobulin, Ig)重链抗原特异性不同，Ig可分为IgG、lgM、IgA、IgE和IgD五种类型。ToRCH抗体检测试剂，主要检测的Ig为病原体特异性IgG和IgM。在病原体感染的初次[体液免疫应答](http://baike.baidu.com/view/3793180.htm)中(原发性感染)，特异性IgM抗体首先出现，但存在时间较短，通常为数周到数月。病原体特异性IgM抗体阳性常提示早期感染，可用于感染急性期的辅助判断。特异性IgG抗体，在免疫接种后、原发性感染及再次感染时都可检出，且较长时间存在。

在感染过程中特异性抗体对抗原亲合力随感染时间的延长而不断升高，检测IgG抗体亲合力，能够较准确地判断感染时间，可作为ToRCH抗体检测的一种补充，高IgG抗体亲合力可辅助排除近期原发性感染。

不同类型的ToRCH特异性抗体检测结果，在ToRCH病原体感染的辅助诊断及免疫状态的评估中，起着重要的指导作用，因此ToRCH特异性抗体检测的准确性至关重要。相关的生产企业必须充分意识到该类产品的潜在风险，根据本指导原则的要求对该类试剂的安全性和有效性进行科学合理的验证。

ToRCH抗体检测试剂是指一类利用免疫学方法，如酶免疫技术和化学发光免疫分析技术等，对人体血清或血浆样本中的ToRCH特异性抗体进行体外定性和/或半定量和/或定量检测的试剂。结合临床表现和其他实验室指标，可用于ToRCH感染辅助诊断及免疫状态的评估。IgG抗体亲合力检测试剂是一类对ToRCH特异性IgG抗体阳性的人体血清和/或血浆样本中ToRCH特异性IgG亲合力进行体外定性检测的试剂，用于辅助判断感染时间，排除近期原发性感染。本类试剂尚不用作产前筛查。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

综述资料主要包括产品临床适用症背景情况、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临床适用范围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。综述资料注册申报资料的重要组分之一，其内容应符合《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，另外，建议申请人对以下几方面内容进行着重介绍：

1．特定病原体的生物学特性，包括形态与结构、抵抗力、感染过程等。

2．特定病原体感染的传播途径、潜伏期、不同人群感染的临床症状、流行病学以及易感人群的说明。

3. ToRCH特异性抗体及特异性IgG抗体亲合力动力学。

## （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，并单独注明文献的相关信息。

结合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，下面对ToRCH抗体和IgG抗体亲合力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）①试剂盒用于体外定性和/或半定量和/或定量，检测人血清和/或血浆样本中xx的特异性IgG或IgM抗体。用于ToRCH病原体感染的辅助诊断及免疫状态的评估。

②试剂盒用于体外定性检测人体血清和/或血浆样本中xx的特异性IgG亲合力。作为ToRCH抗体检测的一种补充，用于辅助判断感染时间，排除近期原发性感染。

（2）简单介绍病原体的特征，如特定病原体的生物学特征、流行病学、潜伏期、易感人群、不同人群感染后的临床表现等临床背景相关的信息介绍；适用人群的介绍，如具有何种症状/体征的患者、相关的密切接触者、相关疾病流行情况、地域要求等。

（3）人群中ToRCH特异性抗体的阳性率、ToRCH特异性抗体的产生、持续时间、临床提示作用及与ToRCH核酸和抗体亲合力等其他检测指标的关联。

（4）ToRCH感染的临床或实验室诊断方法介绍。

（5）明确说明ToRCH特异性IgM抗体检测不得用于无症状人群的产前筛查；不得将本试剂的检测结果单独作为终止妊娠的依据。

（6）特异性IgG抗体的亲合力检测试剂还应介绍亲合力动力学，亲合力高低与感染时间的关系，并明确不得将本试剂IgG抗体的低亲合力结果单独作为近期急性感染判断的依据。

关于预期用途的几点考虑：（1）ToRCH抗体检测试剂作为病原体抗体检测试剂，目前的临床意义仅限于抗体阴阳性及IgG抗体亲合力高低的判断和病原体特异性IgG抗体滴度变化趋势的观察。（2）定量检测试剂可溯源至国家或国际标准品如WHO等标准品。鉴于现在国际标准品的情况和临床需求，建议ToRCH IgM检测试剂的预期用途定义为定性检测。（3）如申报产品声称可用于疫苗免疫效果的评判，则必须以定量试剂盒的形式进行申报。（4）抗体亲合力检测项目的确定，应建立在明确的临床意义和技术可行性基础上。

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；质控品、校准品，应明确具体基质成份，由于可能含有人源组分，应提供灭活方法及无传染性确认的方法等。另外，校准品应明确溯源性，质控品应提交靶值单。

（2）对检测中使用的抗原及抗体的信息进行简单介绍，包括抗原的性质（如重组抗原、纯化的天然抗原、病毒感染细胞的裂解物等）、所用病毒株或重组抗原的表达载体、抗体的动物源性、抗体的性质（单克隆或多克隆）。

（3）试剂盒中不包含但对该项检测必须的组份，企业应列出相关试剂的名称、货号及其他相关信息。

3.【储存条件及有效期】

对试剂盒的效期稳定性、开封稳定性、运输稳定性等信息做详细介绍。

1. 【适用机型】

对于采用酶联免疫吸附法的检测试剂应明确适用酶标仪的波长要求，其他方法学检测试剂应明确具体的适用机型型号。

1. 【样本要求】重点明确以下内容：

（1）样本采集前的要求：如采集时间、采集顺序等，是否受临床症状、用药情况等因素的影响。

（2）样本采集：说明采集方法及样本类型，如有血浆样本，应注明对抗凝剂的要求。

（3）干扰物的影响：明确脂血、溶血、黄疸血等常见干扰物对实验结果是否产生影响，明确可接受的最大干扰物浓度。明确生物污染、纤维蛋白等是否影响检测。

（4）样本处理及保存：样本处理方法、保存条件（如冷藏、冷冻等）及不同保存条件下的保存时限和运输条件等。冷藏、冷冻样本检测前是否需要恢复室温，冷冻样本的冻融次数限制。经热处理样本是否可用、对储存样本的添加剂要求等。

（5）对于ToRCH病原体IgM抗体检测试剂，如果检测系统含有某种IgG抗体的去除技术（IgG吸附剂），如抗人IgG抗体等，则应包括IgG吸附剂使用相关的注意事项。例如：经IgG吸附剂处理的样本不能用于IgG类抗体的检测；在检测IgM类抗体的同时，检测处理过的混合物中的IgG类抗体，以证实对IgG和RF等去除的有效性。

（6）对于IgG抗体亲合力检测试剂应明确适用的特异性IgG抗体阳性样本的浓度范围或信号值范围。

6.【检验方法】详细说明试验操作的各个步骤

（1）实验环境：检测试剂及样本的复温要求及相关注意事项。例如：冻存样本在复融后应经过充分的混匀再行检测。

（2）试剂配制方法、注意事项，试剂开封后使用方法及注意事项等。

（3）高浓度样本稀释的方法及注意事项。

（4）试验条件：操作步骤、温度、时间、仪器波长以及试验过程中的注意事项等。

（5）定标（如适用）：标准曲线的制定，对需要进行重新定标情况的说明及对定标周期的建议。

（6）质量控制：操作步骤，质控结果的要求（试验有效性的判断），质控结果不符合要求的处理方式。如果质控品和病人样本的使用方法不同，生产商应注明必要的指导和解释。建议在质控品结果解释环节注明以下字样：“如果质控结果与预期不符，实验室不应出具检测报告。”

7.【检验结果的解释】

详细描述检测结果的判定标准或计算方法。对阴阳性及血清转换或亲合力高低临床意义的说明，对后续试验的建议。例：对于巨细胞病毒IgG抗体检测灰区样本，建议另外进行巨细胞病毒IgM抗体检测或于2周后进行重复检测；对于IgG抗体亲合力灰区样本，应于2周后进行重复检测。对于半定量和定量的特异性IgG抗体检测试剂，还应明确抗体滴度变化的意义。由于ToRCH IgM假阳性结果可能造成不良后果，建议提示临床医生对所有ToRCH IgM阳性结果应结合临床病史及其他的检测结果综合判断，不得作为ToRCH急性感染诊断的唯一依据。

对于ToRCH IgG定量检测试剂，由于抗体的检测结果与检测方法及量值的溯源性相关，不同检测系统间的结果可能不一致。建议企业给予相关提示。

对于IgG抗体亲合力检测试剂，还应明确指出应配合相应的ToRCH IgG和IgM抗体检测试剂结果进行分析。应提示：临床医生检测的低亲合力结果不得作为近期急性感染判断的依据。

8.【检验方法局限性】

综合产品的预期用途、临床背景、检测方法及适用范围等信息，对可能出现的局限性进行相关说明，主要包括以下描述，请申请人选择适用的条款在产品说明书中予以阐述。

（1）本产品检测结果仅供临床参考，不应作为临床诊治的唯一依据，对患者的临床诊断应结合其症状/体征、病史、流行病学、其他实验室检查（如病原学检测）等信息综合考虑。

（2）感染初期，ToRCH特异性抗体未产生或低于检测限，会导致阴性结果，如怀疑有病原体感染，应提示患者在一段时间内复查，如2周以上，抽取第二份样本，并在与第一份样本同条件下同时检测，以确定是否有初次感染的血清转化或ToRCH特异性IgM或IgG抗体明显升高。（企业应注明第一份样本的保存条件，并提交相应的支持资料。）

（3）ToRCH特异性IgG阴性，可能出现于疾病急性感染的早期，阴性结果应结合临床症状或病原接触情况，并结合其他诊断检测方法加以解释。

（4）对于采用间接法的ToRCH IgM抗体检测试剂，高滴度ToRCH特异性IgG抗体会与特异性IgM抗体竞争抗原结合部位，会使检测的敏感性降低，特异性IgM抗体结果可能会出现假性低值或阴性结果。

（5）由于孕妇ToRCH IgM抗体的实验室检查存在较高的假阳性风险，不能可靠地鉴定胎儿患病的风险，故不建议对无症状孕妇的ToRCH IgM抗体进行筛查。不得将本试剂的检测结果单独作为终止妊娠的依据。

（6）免疫功能受损或接受免疫抑制治疗的患者，如人类免疫缺陷病毒（HIV）感染患者或器官移植后接受免疫抑制治疗的患者，其抗体及抗体亲合力检测的参考价值有限，可能会导致错误的医学解释。

（7）在近几个月内接受过输血或其他血液制品治疗的人群，对其阳性检测结果的分析应慎重。

（8）部分ToRCH（如风疹病毒）特异性IgM抗体不仅出现于初次感染，当二次感染和复发感染时也可能出现。个别个体的ToRCH特异性IgM抗体,在初次感染较长时间后仍能检出，因此对特异性IgM抗体阳性在判断初次感染时间的解释中应慎重。

（9）当处于低流行率地区的无症状人群或已接种过特定ToRCH疫苗的个体检出ToRCH IgM阳性结果时，应警惕可能出现的假阳性结果。同时建议临床医生结合其症状/体征、病史、流行病学、其他实验室检查（如IgG亲合力和病原学检测）进行判断。建议对申报试剂临床研究中的病例人群特征进行说明，并对适用人群的年龄、地域等特征进行明示。

（10）人血清中的异嗜性抗体可能与试剂中的Ig结合干扰试验结果，对于经常接触动物或动物血清制品的人群，应警惕可能出现的异常干扰结果。

（11）接受过小鼠单克隆抗体治疗的患者样本中，可能含有人抗小鼠抗体（human anti-mouse antibodies, HAMA）。对于试剂盒组成成份中含有小鼠源性抗体的检测试剂，若待测样本中含有HAMA，会影响检测结果的准确性。

（12）体内存在的高浓度的链霉亲合素（亲合素）抗体和发光标志物抗体会影响检测结果。

（13）由于ToRCH IgG抗体亲合力成熟过程存在个体差异，个别个体在初次感染较长时间后仍呈现ToRCH IgG抗体低亲合力，因此不得将本试剂IgG抗体的低亲合力结果单独作为近期急性感染判断的依据。

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。

（2）最低检测限：说明试剂的最低检测浓度或滴度，简单介绍最低检测限的确定方法。

（3）企业内部阳性和阴性参考品符合率，简单介绍阳性参考品的来源、浓度梯度、阴性参考品的组成、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交叉反应：对易产生交叉反应的其他病原体的高水平抗体、高浓度ToRCH特异性IgG抗体等的验证情况。

②干扰物质：样本中常见干扰物质对检测结果的影响，如溶血、高脂、黄疸等干扰因子研究（结果应量化表示，禁用轻度、严重等模糊表述），有关高浓度总IgM和总IgG抗体、抗核抗体、类风湿因子、系统性红斑狼疮患者血等的干扰验证。

（6）钩状（HOOK）效应：对高浓度ToRCH特异性抗体钩状效应的验证情况。

（7）对比试验研究（如有）：简要介绍对比试剂（方法）的信息、所采用的统计学方法及统计分析结果。

（8）抗体滴度变化（适用于半定量和/或定量检测试剂）和诊断灵敏度：介绍血清转换盘的来源，将检测结果以图或表的形式列出。

（9）稀释线性（适用于半定量和/或定量检测试剂）：简要介绍评价方法，将评价结果以表格的形式明示。

（10）检测范围（适用于半定量和/或定量检测试剂）：简要介绍检测范围确定的方法及超出检测范围样本的处理方法。

10.【注意事项】应至少包括以下内容：

（1）有关试剂盒内人源组份（如有）生物安全性的警告。如：试剂盒内对照品（质控品）或其它可能含有人源物质的组份，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，故仍应将这些组份作为潜在传染源对待。

（2）有关实验操作、样本保存及处理等其他注意事项。

## （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。

ToRCH抗体定性检测试剂的注册检测应主要包括以下性能指标：物理性状、阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、精密度、最低检测限（分析灵敏度）等。半定量和/或定量抗体检测试剂除上述性能指标外，还应包含线性和准确性指标。阳性参考品主要考察对不同滴度情况下的检测符合性。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特异性抗体和常见干扰物质的假阳性情况的考核。ToRCH IgG抗体亲合力检测试剂，应包含符合率及精密度等要求。

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三个生产批次样品的注册检测。对于已经有国家参考品的项目，在注册检测时应采用相应的国家参考品进行,对于目前尚无国家参考品的项目，生产企业应自行建立稳定的质控体系并提供相应的内部参考品。

## （五）主要原材料研究资料

1．试剂盒所用病原体抗原的制备、筛选、纯化以及鉴定等详细试验资料，主要包括以下两方面：

（1）企业自制抗原

如为天然抗原，则应对病原体毒株选择、病原体培养、抗原提取及纯化、鉴定等实验过程予以详述；如为重组抗原，则应提交有关特定基因选择、基因序列、质粒转化、抗原表达及抗原纯化、鉴定等详细内容。

（2）企业外购抗原，则应详述抗原的名称及生物学来源，外购方名称，提交外购方出具的抗原性能指标及检验证书，详述申请人对该抗原技术指标的要求以及申请人确定该抗原作为主要原材料的依据。供货商应相对固定，不得随意更换。

2．试剂盒所用抗体的制备、筛选、纯化以及鉴定等详细试验资料，主要包括以下两方面：

（1）企业自制抗体

如使用天然抗原作为免疫原则应明确该天然抗原的来源；如使用重组抗原或其他人工合成抗原作为免疫原，应提供相应的核酸组分及重组抗原的序列信息。申请人对所选抗体的技术指标要求（如外观、纯度、蛋白浓度、效价等），确定该抗体作为主要原材料的依据；

（2）企业外购抗体，应详述抗体的名称及生物学来源，外购方名称，提交外购方出具的抗体性能指标及检验证书，详述申请人对该抗体技术指标的要求以及申请人确定该抗体作为主要原材料的依据。供货商应相对固定，不得随意更换。

3.其他主要原辅料的选择及验证资料，如固相载体、化学发光剂、反应缓冲液等，该类原辅料一般均为外购，应详述每一原辅料的外购方名称，提交外购方出具的每一原辅料性能指标及检验证书，详述申请人对每一原辅料技术指标的要求以及申请人确定该原辅料作为主要原辅料的依据。

4.试剂盒内质控品和/或校准品的制备、定值和/或溯源及相关的实验验证资料。校准品应溯源至现行的国家或国际参考品，质控品应至少包含阴性和阳性两个水平。校准品和质控品基质应与待测样本相同或相似。

5.企业内部参考品的原料选择、制备、定值、统计学分析及相关的实验验证资料。应提供对参考品性质确认的方法或试剂（建议采用国内已上市的、临床上普遍认为质量较好的同类试剂）的相关信息。阴性参考品除正常血清样本外，还应包含可能产生干扰的溶血、脂血、黄疸及自身免疫性疾病患者血和其它易混淆、交叉的感染性疾病患者血的特异性血清样本。

## （六）主要生产工艺及反应体系的研究资料

1.主要生产工艺介绍，可用流程图方式表示，并简要说明主要生产工艺的确定依据。

2.产品基本反应原理介绍。

3.包被工艺研究，申请人应考虑如包被液量、浓度、时间等指标对产品性能的影响，通过试验确定上述指标的最佳组合。

4.显色（发光）系统、酶作用底物等的介绍。

5.实验体系反应条件确定：申请人应考虑反应时间、反应温度、洗涤次数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。

6.酶催化底物（发光或变色）的最适条件研究。

7.体系中样品加样方式及加样量确定：申请人应考虑样品加样方式、加样量对产品检测结果的影响，通过实验确定最佳的加样方式及加样量。如样本需采取稀释或其他必要的方法进行处理后方可用于最终检测，申请人还应对可用于样本稀释的基质或处理方法进行研究，通过试验确定最终选择的用于样本稀释的基质或处理方法。

## （七）分析性能评估资料

企业应提交在产品研制或成品验证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、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。

1.最低检测线

选取特定滴度的ToRCH特异性抗体样本，做系列倍比稀释，将检测结果的阳性率在90%以上（n≥20）的最大稀释倍数作为试剂盒的最低检测限。

对于有国际或国家定量参考品的检测项目，（目前仅限于TOXO IgG和RV IgG）和半定量IgG检测项目，最低检测限的确定可采用在一次运行中将空白样本重复测定20次，计算20次结果的均值与标准差SD，以空白均值加两倍标准差的方法，或其它合理的方法。

1. 抗体滴度变化（适用于半定量和/或定量检测试剂）和诊断灵敏度

①ToRCH抗体检测试剂：介绍血清转换盘的组成和来源。检测血清转换盘，用于评价检测试剂的诊断灵敏度及监测抗体滴度变化趋势的能力。对于TOXO、RV等已有商业化血清转换盘的检测项目，应选用商业化血清转换盘进行研究；对于部分无商业化血清转换盘的检测项目，可选择合理的方法,如将标化的血清样本稀释等，对抗体滴度变化及诊断灵敏度进行评价。

②ToRCH IgG抗体亲合力检测试剂：对急性感染（3-4个月内）和既往感染样本进行研究，样本可来自于血清转化盘或基于临床诊断的临床样本，以评价临床诊断灵敏度。

3.分析特异性

（1）交叉反应

①对抗原结构相近或临床症状相似的其他病原体（见表1）感染病人的高水平特异性抗体血清进行交叉反应研究，其中用于交叉反应研究用的抗体类型应与待测目的抗体类型相同，如检测ToRCH IgG抗体，则应研究其与相关病原体特异性IgG抗体的交叉反应。

②高浓度病原体特异性IgG抗体与特异性IgM抗体的交叉反应验证。

③如果检测试剂采用基因重组抗原，应增加对重组基因导入微生物特异性抗体的交叉反应评价。例如，如果采用大肠杆菌作为宿主菌，采用原核载体作为表达载体，建议考虑大肠杆菌宿主自身蛋白以及载体骨架编码的蛋白与被测物之间可能产生的交叉反应。

申请人应提交所有用于交叉反应验证的病原体来源信息、对于有国家或国际参考品的交叉反应物质还应提供浓度确认等相关信息。建议申请人将有关交叉反应验证的信息以列表的方式在产品说明书的【产品性能指标】项中列出。

表1 用于交叉反应研究的病原体（推荐）

|  |
| --- |
| 微生物 |
| 其它ToRCH病原体\* |
| E-B病毒\* |
| 细小病毒B19 |
| 乙型肝炎病毒\* |
| 甲型肝炎病毒\* |
| 水痘-带状疱疹病毒\* |
| 甲型流感病毒 |
| 乙型流感病毒 |
| 副流感病毒 |
| 肺炎支原体\* |

注：\*标注的为必做项目

（2）干扰实验

①内源性干扰

对样本中常见的内源性干扰物质（见表2）进行检测。方法为：对ToRCH特异性抗体阴性、弱阳性（临界浓度）的临床或模拟添加样本分别进行验证，样本量选择应具有统计学意义，说明样本的制备方法及干扰实验的评价标准，确定可接受的干扰物质的极限浓度。

②抗凝剂的干扰

如果试剂盒适用样本类型包括血浆样本，应采用各种适用抗凝剂抗凝的血浆样本分别与血清样本进行对比实验研究。方法如下：对不少于50例源自同一患者的ToRCH特异性抗体阴性和弱阳性（略高于CO值）的血清和血浆样本进行检测，以验证申报试剂对于血清和血浆样本的检测结果的一致性；如适用于几种抗凝剂，建议对不少于50例源自同一患者的ToRCH特异性抗体阴性和弱阳性（略高于CO值）的不同抗凝剂的血浆样本进行检测，以验证抗凝剂之间的一致性。

③ToRCH IgM抗体检测特异性验证

可采用对至少10份含有ToRCH特异性IgM抗体的样本进行IgM破坏实验研究，方法为采用特定的化学制剂（如2－巯基乙醇或二硫苏糖醇）处理样本后，重新进行检测，IgM检测结果应为阴性；或者选用其他合理的方法进行验证。

表2 建议用于干扰研究的物质（推荐）

|  |
| --- |
| 物质 |
| 总IgG |
| 总IgM |
| 胆红素 |
| 游离血红蛋白 |
| 甘油三酯 |
| 系统性红斑狼疮患者血 |
| 抗核抗体 |
| 类风湿因子 |
| 抗线粒体抗体 |
| HAMA（如适用） |

4.精密度

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，除申报试剂本身外，还应对实验地点、检测仪器等要素进行相关的验证。

（2）设定合理的精密度评价周期，如有条件，建议申请人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含阴性、弱阳性和强阳性三个水平。

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并结合国家标准或行业标准的相关要求（如有）自行设定企业内部参考品，阳性参考品应着重考虑抗体滴度要求，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、抗体滴度等信息进行精确的实验验证，并提交详细的验证资料。

6.钩状（HOOK）效应

须采用高滴度的ToRCH特异性抗体的血清进行梯度稀释后由低浓度至高浓度开始检测，每个梯度的稀释液重复3-5份，对钩状效应进行合理的验证。建议在产品说明书上明示对钩状效应的研究结果。

对于半定量和定量检测试剂，除上述7条外，还应包含对稀释线性（准确性）和检测范围的评估资料。

1. 稀释线性（准确性）

可采用如下方法进行：对至少两个水平的血清样本进行梯度稀释，计算稀释血清的活性并与稀释系数相乘以计算未稀释血清的活性，比较计算所得抗体活性与已知值之间的差异。申请人也可以选择其它合理的方式，如回收试验等，对检测范围内的准确性进行评价。

2. 线性范围

建立试剂线性范围所用的样本基质应尽可能与临床实际检测样本相似，理想的样本为分析物浓度接近预期测定上限的混合人血清，且应充分考虑多倍稀释对样本基质的影响。建立一种定量测定方法的线性范围时，需在预期测定范围内选择7-11个浓度水平。例如，将预期测定范围加宽至130%，在此范围内选择更多的浓度水平，然后依据实验结果逐渐减少数据点直至表现出线性关系，可发现最宽的线性范围。

## （八）参考值（范围）确定资料

重点提交对申报试剂阴性/灰区/阳性等结果判断的CO（cut-off value）值确定的实验研究资料，应包括具体的试验方案、人群选择、评价标准、统计学分析和研究数据等研究资料。建议采用受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve, ROC）的分析方式来选择确定合理的CO值，如实验结果分析存在灰区（equivocal zone），则应明确灰区建立的基础。CO值建立的样本来源选择应考虑到地域性、季节、不同的感染阶段和生理状态等因素的影响，并明确CO值在不同的样本类型是否有差异。对CO值建立后所产生的临床灵敏度和特异性进行充分判断，使产生假阴性或假阳性结果的可能性均降至最低。

对于采用酶联免疫分析技术的检测试剂，在各检测条件固定的情况下，申请人也可以采用确定临界值的常用方法，通过：①确定临界值中的n数值（临界值=阴性样品平均A值+n×标准偏差）；②确定阴性样品A值的标准差；③临床样本临界值的验证；这三个步骤检测并计算确定试剂盒的临界值。

## （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、高温加速破坏稳定性、运输稳定性及开瓶稳定性（如涉及）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。

考虑到样本中抗体对储存环境普遍敏感，申请人应对各种储存条件下的样本稳定性进行合理的验证，以确认不同类型样本的短期、长期保存条件及效期。需要冷冻保存的样本应对冻融次数进行合理的验证。某些用于防腐、冷冻用途或起稳定保护作用的添加剂（如叠氮化物）可能会对检测造成影响，如涉及，请对该添加剂的影响进行合理验证。

另外，如果要用于加热样本（如热灭活）的检测，则应对加热前后的ToRCH特异性抗体阳性及阴性样本进行加热因素的干扰验证。方法为对临界值附近的至少10份弱阳性加热和未加热样本进行对比检测，比较检测结果的差异；对至少10份阴性加热和未加热的样本进行对比检测，比较检测结果的差异。

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）临床试验资料

1. 研究方法

（1）对于“已有同品种批准上市”产品的临床研究，选择已批准上市产品、临床普遍认为质量较好的同类产品作为对比试剂，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。考虑到试剂盒的预期用途，临床试验中阳性和阴性样本均应包括一定量的非冻存样本。

对于ToRCH特异性IgM检测试剂，申请人还应对急性期患者样本进行考核试剂与参考方法的一致性研究，以评价考核试剂的临床灵敏度和特异性。用于评价的样本可选择处于感染急性期患者的新鲜采集样本（TOXO IgM项目不少于10例，其他三项不少于30例）；或者选择商业血清转化盘（不少于5套）；或者选择新鲜采集样本联合商业血清转化盘。参考方法可以采用用于感染急性期判断的方法，例如：ToRCH特异性IgG抗体的血清学转换（动态监测2份或以上的血清IgG，恢复期与急性期比较IgG呈4倍以上升高）、核酸检测或直接抗原检测等方法，对于ToRCH感染急性期的判断应密切结合患者的临床诊断综合进行。建议TOXO IgM检测试剂进行与Sabin-Feldman染色试验（DT）方法结合间接免疫荧光法和/或其它可有效诊断和公认的方法的一致性研究。

（2）目前，部分IgG抗体亲合力检测项目无已上市的同类产品，对于该类申报试剂的临床研究，建议以ToRCH特异性抗体血清学结果（包括血清学转换）结合临床诊断作为对比方法，进行临床研究。

1. 临床研究单位的选择

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ToRCH感染疾患诊疗或分子生物学方法（若临床试验中涉及此方法）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，考核试剂和对比试剂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。

1. 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。各研究单位选用的对比试剂应保持一致，以便进行合理的统计学分析。

1. 病例选择及样本类型

临床试验应选择预期适用人群，包括高流行率地区育龄妇女及孕妇、具有ToRCH感染症状/体征、相似症状或与传染源有密切接触史等的人群，作为研究对象。对于ToRCH特异性IgG半定量和/或定量检测试剂，样本待测物浓度应覆盖检测范围。企业在建立病例纳入标准时，应考虑到不同人群的差异，尽量覆盖各类适用人群。临床研究中ToRCH特异性IgM抗体阳性且特异性IgG抗体阴性样本，不少于120例，IgG抗体低亲合力样本例数不少于90例，且每家医院的阳性和阴性样本例数应尽量考虑样本的分布。对于阴性病例的选择，也应考虑对交叉反应和干扰因素的评价，企业应选择除靶病原体之外的其他易混淆的病原体感染患者、自身免疫性疾病患者、溶血、脂血、黄疸样本进行检测，以从临床角度考察其分析特异性。

CMV等ToRCH病原体的感染率较高，对该类ToRCH特异性IgG阳性的样本，若随机收样进行IgG抗体亲合力检测，很难获得近期感染的低亲合力样本。因此，建议先对入组样本进行有针对性地筛选，如：选择同一厂家的配套试剂盒检测ToRCH特异性IgG抗体，选择高浓度的IgM抗体、低浓度的IgG抗体作为亲合力检测的入组样本；或者，选择同一厂家的配套试剂盒检测ToRCH特异性IgM和ToRCH特异性IgG抗体，二者同时为阳性的样本可作为亲合力检测的入组样本。建议在临床报告的试验设计和研究结果中对入组样本的筛选过程进行详细描述。

1. 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、ROC分析和阴性/阳性符合率等。对于本类定性检测试剂对比实验的等效性研究，常选择配对2×2表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行χ2检验或kappa检验以检验两种检测试剂检测的一致性。统计学分析应可以证明两种方法的检测结果无明显统计学差异，并验证其一致性是否具有统计学意义。以kappa检验为例，除应计算kappa值外，还应对总体kappa值与“0”之间的差别是否具有统计学意义进行假设检验。对于半定量检测试剂对比实验的等效性研究，应在上述统计分析的基础上，根据临床试验数据分布特点，采用Person相关系数等统计方法对考核试剂检测值与对比试剂检测值线性相关关系进行分析。在临床研究方案中应明确统计检验假设，即评价考核试剂与对比试剂是否等效的标准。对于定量检测试剂对比实验的等效性研究，用回归分析验证两种试剂结果的一致性，建议统计学负责人根据试验设计特点，选择适用的回归分析方法，如Deming回归、Passing-Bablok回归分析等。

1. 结果差异样本的验证

在数据收集过程中，对两种试剂检测结果明显不一致的样本，应采用金标准或临床上普遍认为质量较好的第三种同类试剂进行确认试验，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。如果考核试剂与对比试剂的检测结果显示不一致样本均是位于二者的临界值附近并且例数很少（如低于总例数的1%），则对不一致原因作简要分析即可，不须进行第三方复核。注意，如果有必要选择第三方试剂复核，建议先采用第三方试剂对一定数量的考核试剂和对比试剂检测结果一致的样本（包括阳性和阴性结果）进行检测，以对第三方试剂选择的合理性进行评估。

1. 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申报试剂和对比试剂的名称、批号、有效期等信息。

②对各研究单位的病例数、人群分布情况进行总合，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、质控品检测情况，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）临床研究结果及分析

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、对灰区样本、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结果的一致性分析

计算阳性符合率、阴性符合率、总体符合率及其95%（或99%）的置信区间。采用适当的统计学方法，对定性检测试剂进行一致性评价，对半定量检测试剂进行线性相关性分析，对定量检测试剂进行一致性分析。另外考虑到对不同样本类型以及不同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、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. Review Criteria for In Vitro Diagnostic Devices for Detection of IgM Antibodies to Viral Agents, CDRH FDA, USA February 27, 1997.
5. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Specifications for immunological testing for infectious diseases; Approved guideline, LA18-A2, 2001.
6. 王玉兰，吴建民，《临床免疫学与检验》，第4版，人民卫生出版社，2007年7月
7. 李卫，《医疗器械临床试验统计方法》，第一版，人民军医出版社，2012年9月。
8. 陈敬贤，《诊断病原体学》，第一版，人民卫生出版社，2008年4月。
9. 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。

10.《中国生物制品规程》（2000年版），化学工业出版社

11．Class II Special Controls Guidance Document: Herpes Simplex Virus Types 1 and 2 Serological Assays , CDRH FDA, 2011年8月9日。

12.National Committee for Clinical Laboratory Standards. Clinical use and interpretation of serologic tests for toxoplasma gondii; Approved guideline,M36-A,2004。

13．焦奎，张书圣《酶联免疫分析技术及应用》，第一版，化学工业出版社，2004年8月。

**五、起草单位**

国家食品药品监督管理局医疗器械技术审评中心