

## 附件 1

# 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂 注册技术审查指导原则

### 一、前言

本指导原则旨在指导注册申请人对乙型肝炎病毒（hepatitis B virus, HBV）脱氧核糖核酸（deoxyribose nucleic acid, DNA）定量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。

本指导原则是对乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸（HBV DNA）定量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。如申请人认为有必要增加本指导原则不包含的研究内容，可自行补充。

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

乙型肝炎病毒（HBV）感染是一个严重的公共卫生问题，我国属乙型肝炎感染地方性流行区。根据 2006 年全国乙型肝炎流行病学调查，我国

的慢性 HBV 感染者约 9300 万人，其中慢性乙型肝炎患者约 2000 万例，每年因乙型肝炎导致的肝硬化和肝癌死亡约 30 余万例，新发乙型肝炎病例约 50 万~100 万例，乙肝防治是当前及今后相当长时间内要面临的重要任务。

乙型肝炎是血源传播性疾病，主要经血（如不安全注射等）、母婴及性接触传播。HBV 属嗜肝脱氧核糖核酸（DNA）病毒科（hepadnaviridae），基因组长约 3.2 kb，为部分双链环状 DNA。急性 HBV 感染 DNA 存在先阳性后消失的发展过程，慢性 HBV 感染的自然史一般可分为 4 个期，即免疫耐受期、免疫清除期、非活动或低（非）复制期和再活动期，其中免疫耐受期 HBV DNA 滴度较高（大于 20 000 IU/ml），免疫清除期表现为血清 HBV DNA 滴度大于 2000 IU/ml，但一般低于免疫耐受期。非活动或低（非）复制期滴度较低（小于 2000 IU/ml），部分再活动期患者表现为 HBV DNA 活动性复制，但并不是所有 HBV 感染者都经历以上四期。

HBV 已发现有 9 个基因型（A~I），每个基因型又可分为不同亚型，且存在基因型之间的重组现象。我国已发现 A、B、C、D 基因型，中东部地区以 B、C 基因型占优势，其中北方地区（长江以北）主要为 C2 亚型；南方大部分地区流行株为 B2、C2、C1 亚型，并有少部分 D 基因型；西部地区尤其是新疆地区以 D 基因型为主，西部藏族居民中以 C/D 重组基因型为主；A 型和 B1 亚型罕见。

HBV DNA 定量检测试剂是指利用包括实时荧光聚合酶链反应（polymerase chain reaction, PCR）或其他的分子生物学方法在内的核酸检测技术，以 HBV 基因序列为检测靶标，对人血清、血浆及其他人体样本中的 HBV DNA 进行体外定量检测的试剂。结合临床表现和其他实验室指标，可作为乙型肝炎辅助诊断的指标之一，还可通过对血液中 HBV DNA 浓度的检测可用于 HBV 感染的辅助诊断、治疗适应症的选择及抗病

毒疗效的判断。

本指导原则适用于实时荧光 PCR 方法的 HBV DNA 定量检测试剂，其他类同用途的核酸定量检测方法可参照本指导原则，但应根据产品特性确定其中具体内容是否适用，如不适用，应另行选择符合自身方法学特性的技术要求或评价方法。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。

本指导原则不适用于国家法定血源筛查用 HBV DNA 检测试剂。

### 三、基本要求

#### （一）综述资料

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，其中同类产品信息介绍部分应着重从方法学及检出限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）》（国食药监械〔2007〕229号）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、试验原理、试验方法、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》（国食药监械〔2007〕240号）的要求，境外产品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，并单独列明参考文献的相关信息。

结合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》（国食药监械〔2007〕240号）的要求，下面对 HBV DNA 定量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制定产品说明书。

1. 【预期用途】应至少包括以下几部分内容：

（1）试剂盒用于定量检测人血清、血浆等样本中的 HBV DNA，适用样本类型应依据申报产品的分析性能评估和临床研究情况进行确认。

（2）待测人群特征介绍：主要为接受抗病毒治疗的乙型肝炎患者。

（3）临床用途：主要通过对乙型肝炎患者血中 HBV DNA 基线水平和变化情况的监测，用于评估抗病毒治疗的应答和治疗效果监测。

如有其他用途（如隐匿性感染的辅助诊断）则应对产品适应症人群、预期用途另行说明，并提供与之相应的分析性能评估以及临床验证等资料。本指导原则内容仅针对治疗监测用途进行要求。

（4）应当说明该试剂检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标，必须结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

（5）明确说明该检测试剂不得用于血源筛查。

2. 【主要组成成分】

（1）说明试剂盒所包含组分的名称、数量、比例或浓度等信息，如定量标准品、阴/阳性质控品含有人源组分，应提供其生物学来源、活性及其他特性；说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。

（2）试剂盒中不包含但该项检测必需的组分，说明书中应列出相关试剂/耗材的名称、注册证号（如有）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、注册证号（如有）以及配套仪器等详细信息。

### 3. 【储存条件及有效期】

说明试剂盒的效期稳定性、开封稳定性、复溶稳定性、运输稳定性、冻融次数要求等，应标明具体的储存条件及效期。

### 4. 【样本要求】

(1) 样本收集要求：结合临床需要并参照慢性乙型肝炎防治指南（现行版）推荐的采样要求。

(2) 血液样本应当说明对采血管及抗凝剂的要求：明确样本类型、采血管和抗凝剂，其他样本应说明样本采集、处理及保存方式。

(3) 样本处理、运送及保存：对血液样本离心条件的要求，核酸提取前的预处理、运送条件、保存条件及期限（短期、长期）等。冷藏/冷冻样本检测前是否需恢复至室温，冻融次数的要求。如有需要应对高于检测范围的样本稀释方法进行规定。

5. 【适用机型】注明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】详细说明试验操作的各个步骤，包括：

(1) 试剂准备及配制方法、注意事项。

(2) 详述待测样本、相关校准品及质控品核酸提取的条件、步骤及注意事项。

(3) 核酸提取/纯化方法的详细介绍。

(4) 扩增反应前准备：加样体积、顺序等。

(5) PCR 各阶段的温度、时间设置、循环设置及相关注意事项。

(6) 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。

(7) 基线、循环阈值（Ct 值）的选择方法。

(8) 校准方法的描述。

(9) 实验的有效性判断：试剂盒内阴/阳性质控品、内标的 Ct 值要求。

#### 7. 【检验结果的解释】

检验结果应用 IU/ml 表示，结合阴、阳性质控结果，对低于检出限未检出、低于定量限、检测范围内及高于检测范围的检测结果分别进行界定。

#### 8. 【检验方法的局限性】

(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) 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。

(3) 明确该试剂仅限于规定的样本类型及适用机型。

#### 9. 【产品性能指标】详述以下性能指标：

(1) 对相应国家参考品的符合情况。

(2) 最低检出限及定量限：说明试剂不同样本类型的最低检出浓度和最低定量浓度，简单介绍最低检出限/定量限的确定方法以及对最低检出限/定量限验证所采用的基因型。

(3) 精密度：精密度参考品的组分、浓度及评价标准、评价结果。

(4) 线性范围：确定线性范围的方法、浓度范围、相关系数等信息。

(5) 对不同基因型的覆盖：验证该试剂对 HBV 不同基因型的检测效果。

(6) 特异性：

①临床特异性：应采用一定数量的临床 HBV DNA 阴性样本进行验证。

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，如血红蛋白、甘油三酯、胆红素等，应注明可接受的最高限值。

④药物影响：常用抗病毒药物、干扰素等对检测结果的影响，如未进行相关研究也应提供相关警示说明。

(7) 对比试验研究：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。

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：试剂盒内校准品、质控品或其他可能含有人源物质的组分，虽已通过乙型肝炎表面抗原（HbsAg）、人类免疫缺陷病毒抗体（抗-HIV1/2）、丙型肝炎抗体（抗-HCV）等项目的检测为阴性，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) 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员，应严格按照说明书要求进行操作。

### **(三) 拟定产品标准及编制说明**

拟定产品标准应符合国食药监械〔2007〕229 号和国食药监械〔2007〕609 号文件的相关规定。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区域，引物/探针来源及验证情况，各种酶的来源、特性以验证情况等信息的重点内容予以明确。

HBV DNA 定量检测试剂的注册检测应符合相应国家参考品检测要求。产品的性能指标应与说明书内容相符。

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

根据国食药监械〔2007〕229号要求，首次申请注册的第三类产品应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HBV DNA项目，在注册检测时应采用相应的国家参考品进行。

#### （五）主要原材料研究资料

应提供主要原材料如引物、探针、酶、标准品或企业参考品等的选择与来源、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，其生产工艺必须稳定；如主要原材料源于外购，应提供的资料包括：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. 企业内部参考品的制备、定值过程。**建议采用灭活病毒的血清/血浆建立参考品，不宜使用质粒。**

2. 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。

3. 聚合酶链反应（PCR）组分的主要材料（包括引物、探针、内标、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、保存稳定性等的详细验证资料。

##### （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或其他适宜方法纯化，并对序列准确性、

纯度、稳定性、功能性实验等的验证。如为外购，应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如聚丙烯酰胺凝胶电泳法（PAGE）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 PAEG 或其他适宜方法纯化，在 5'-端(和/或 3'-端)进行标记，如荧光素报告基团或其他发光标记物，在 3'-端标记荧光素淬灭基团，并经 HPLC 或其他适宜方法纯化，纯度应达到高效液相色谱纯。如为外购，应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如 HPLC 分析图谱；应对探针的核酸序列及标记的荧光素或化学发光物进行核实，并作 HPLC 分析。

### （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；应提供有关保存稳定性、活性及功能实验等的验证资料。

4. 内对照（内标）、校准品及质控品的原料选择、制备、定值过程及试验资料。内标设置应合理，质控品宜采用混合阴性人血浆或血清作为基质。

5. 核酸类检测试剂的包装材料和耗材应无脱氧核糖核酸酶（Dnase）和核糖核酸酶（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。

生产工艺研究的资料应能对反应体系涉及到的基本内容，如样本类型、样本用量、试剂用量、反应条件、校准方法、质控方法、稳定性和有效期，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、PCR 方法学特性介绍。

4. DNA 提取纯化方法优化，建议包含纯化步骤，内标、校准品、质控品均应全程参与提取纯化，**不建议采用煮沸法进行 DNA 提取。**

5. 确定最佳 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、样本量、加样量及反应体积等。**样本量应不少于 200 微升，加样量和反应体积参考相应行业标准，经研究验证后确定。**

6. 确定 PCR 各阶段温度、时间及循环数的研究资料。

7. 对于基线阈值 (threshold) 和阈值循环数 (Ct) 确定的研究资料。

8. 不同适用机型的反应条件的对比分析，如果有差异应分别详述。

另外，对于试剂盒的内标、校准品、质控品设置，建议企业参考以下要求执行：

(1) 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，但又不能对目的基因的检测造成竞争性抑制而导致假阴性，对内标的 Ct 应有明确的范围要求。

(2) HBV DNA 定量检测试剂的**质控品应至少设置三个量级水平的系列质控品：临界阳性质控品、强阳性质控品和阴性质控品。**校准品和质控品均应参与样本核酸的**平行提取**，以对整个 PCR 反应过程、试剂/设备、交叉污染等环节进行合理质量控制。企业应对各种质控品的 Ct 做出明确的范围要求。

## （七）分析性能评估资料

申请人应提交生产者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，对于每项分析性能的评价都应包括具体研究目的、实验设计、研究方法、可接受标准、实验数据、统计方法等详细资料。有关分析性能验证的背景信息也应在申报资料中有所体现，包括实验地点（实验室）、适用仪器、试剂规格、批号、临床样本来源等。分析性能评价的实验方法可以参考相关的美国临床实验室标准化协会批准指南（CLSI-EP）文件或国内有关体外诊断产品性能评估的指导原则进行。对于 HBV DNA 定量检测试剂，建议着重对以下分析性能进行研究。

### 1. HBV DNA 提取

病毒 DNA 提取主要有以下目的：富集目的基因浓度、保证目的基因序列的完整性、增加 PCR 模板溶液均一性、去除 PCR 抑制物，是决定 PCR 成败的关键环节。因此，无论申报产品是否含有 DNA 分离/纯化的组分，企业都应对核酸提取的环节做详细的验证。临床标本中可能含有各式各样的 PCR 抑制物，因此，对于 DNA 提取试剂的选择，除最大量分离出目的 DNA 外，还应有纯化步骤，尽可能去除 PCR 抑制物。目前常见的 DNA 分离纯化方法和改良方法各有优势和不足，申请人应结合申报产品的特性，合理选择 DNA 分离/纯化试剂，并提供详细的验证资料（提取效率、与后续试验的配合等）。

### 2. 最低检出限与定量限（分析灵敏度）

#### （1）最低检出限与定量限的确定

建议使用国际参考品/国家参考品进行梯度稀释并多次检测，将具有 95% 以上阳性检出率的病毒水平作为最低检出限。建议最低检出限应不高于 30IU/ml。

定量限应高于或等于检出限，将多次（至少 10 次）测量的结果符合

试剂准确度要求的最低病毒水平作为定量限。

#### (2) 最低检出限和定量限的验证

申报试剂应在最低检出限或接近最低检出限的病毒浓度对不同基因型（至少包括 B、C、D 型）进行验证，总测试数不少于 60 次。定量限的验证应对不同基因型（至少包括 B、C、D 型）进行验证，总测试数不少于 40 次。

企业应能够提供用于最低检出限/定量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。

#### 3. 线性范围

线性范围确定的研究应使用高值临床样本（由可溯源至国家参考品/国际参考品的方法定量）进行梯度稀释，稀释液应使用经确认为阴性的混合人血清或血浆，应包含不少于 9 个浓度（应包含接近最低检测限的临界值浓度），使用至少 3 个批次的试剂进行试验。通过评价一定范围内的线性关系及各水平的准确度确定该产品的线性范围。

#### 4. 准确度

对测量准确度的评价依次包括：与国家参考品（和/或国际参考品）的比对研究、回收实验、方法学比对等方法，企业可根据实际情况选择合理方法进行研究。

##### (1) 国家/国际参考品验证

此类检测试剂有相应的国家/国际参考品，应使用国家/国际参考品对试剂进行验证，重点观察对相应参考品检测结果的符合情况。

(2) 回收试验。用于评估定量检测方法准确测定加入纯分析物的能力，结果用回收率表示。通常对样本进行 3~5 次回收试验，取平均值即平均回收率。

**回收试验注意事项：**

- ①加入的标准液体积一般应小于样本体积的 10%;
- ②尽量使加入标准液后样本中的被测物浓度接近医学决定水平;
- ③标准物的浓度应该足够高, 以得到不同浓度的回收样本;
- ④注意基质效应, 尽量采用与临床待测样本一致的基质

### (3) 方法学比对

采用参考方法或国内/国际普遍认为质量较好的同类试剂作为对比方法, 与拟申报试剂同时检测一批病人样品, 从测定结果间的相关性了解拟申报试剂与参比方法间的一致情况。如显著相关, 说明两检测系统对病人标本测定结果基本相符, 对同一份临床样本的医学解释, 拟申报试剂与对比方法相比不会产生显著差异结果。

在实施方法学比对前, 应分别对拟申报试剂和对比试剂进行初步评估, 只有在确认两者都分别符合各自相关的质量标准后方可进行比对试验。方法学比对时应注意质量控制、样本类型、浓度分布范围并对结果进行合理的统计学分析。

## 5. 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美国临床实验室标准化协会批准指南 (CLSI-EP) 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 (包括提取组分和聚合酶链反应组分) 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四个水平：

①阴性质控品：不含乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸（HBV DNA）的质控品，不得检出阳性（ $n \geq 20$ ）。

②临界阳性质控品：待测物浓度略高于试剂盒的最低检出限，阳性检出率应高于 95%（ $n \geq 20$ ）。

③弱阳性质控品：待测物浓度呈弱阳性（高于定量限浓度 1 个数量级），阳性检出率为 100%且变异系数（CV）符合标准要求（ $n \geq 20$ ）。

④强阳性质控品：待测物浓度呈中度至强阳性，阳性检出率为 100%且 CV 符合标准要求（ $n \geq 20$ ）。

## 6. HBV 不同基因型的覆盖

应对乙肝病毒不同基因型（至少包括 B、C、D 型）进行检测，重点考察各基因型病毒样本的分析灵敏度、准确性及精密度指标，每个基因型的病毒样本稀释成至少 3 个浓度水平，对每水平样本进行重复测定。

## 7. 特异性

### (1) 交叉反应

①用于 HBV DNA 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、易引起相同或相似临床症状（推荐种类见表 1）。

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  $10^6$  cfu/ml 或更高，病毒为  $10^5$  pfu/ml 或更高。

③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 用于交叉反应研究的微生物（推荐）

微生物
人巨细胞病毒
E-B 病毒
人类免疫缺陷病毒
丙型肝炎病毒
甲型肝炎病毒
梅毒
人类疱疹病毒 6 型
单纯疱疹病毒 1 型
单纯疱疹病毒 2 型
甲型流感病毒
痤疮丙酸杆菌
金黄色葡萄球菌
白色念珠菌

## (2) 干扰物质

①潜在的干扰物质主要包括：内源性物质（见表2）和常用的治疗药物如普通IFN $\alpha$ （2a、2b和1b）和聚乙二醇干扰素 $\alpha$ （2a和2b）[PegIFN $\alpha$ （2a和2b）]、拉米夫定（lamivudine）、阿德福韦酯（adefovir dipivoxil）、恩替卡韦（entecavir）、替比夫定（telbivudine）等。

②使用医学相关水平的干扰物浓度进行验证，另外，亦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。对于常见药物干扰试验，建议参照相应药物药代动力学研究确定的治疗药物浓度

添加相应药物进行干扰验证。

③建议在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（推荐）

物质
人白蛋白
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
总 G 型免疫球蛋白 (IgG) *

\*为必须验证的干扰物质。

## 8. 溯源性

应提交详细的溯源性研究资料。企业制备的企业内部参考品、二级参考品、用于制备商品化校准品的储备液以及不同基因型的阳性样本均应能够溯源至国家参考品/国际参考品。使用国家参考品/国际参考品为校准品，应用多台仪器对企业一级参考品进行校准，以下逐级对企业二级参考品、校准储备液、阳性参考品进行校准。

## 9. 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。如适用于不同样本类型，应提交对不同样本类型一致性的验证，包括不同抗凝剂、采血管的验证。

## （八）参考值（范围）确定资料

对于此类试剂，正常人群中不应检出 HBV DNA，参考值确定资料主要是指 Ct 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。

应对样本稳定性进行研究，主要包括室温保存、冷藏和冷冻条件下的有效期验证，可以在合理的温度范围内选择温度点（温度范围），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。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**

对于该类试剂已有同类产品上市，按照法规要求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或优于已上市产品。

建议预实验选择两种对比试剂同时进行验证，考察其误差范围，选择其中一种作为正式试验的对比试剂，另一种可作为第三方试剂。对比试剂的适用样本类型及检测范围应能够涵盖考核试剂的样本及检测性能

要求，以免造成考核试剂部分性能无法验证的情况。

对比试验结果不一致（检测值差异较大）的样本应采用公认较好的第三方试剂进行验证。

## 2. 临床研究单位的选择

建议申请人在选择临床研究单位时，应考虑到各试验单位之间的平行性和一定的地域代表性，临床研究单位应具有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。

## 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。各研究单位选用的对比试剂应一致，以便进行合理的统计学分析，同时方案中应明确写明对于对比试验研究中测定结果不符的样本进行确认试验的第三方试剂或方法。

## 4. 病例选择及样本类型

临床试验应样本数需不少于 500 例，其中应主要选择乙型肝炎患者

样本(阳性样本),不少于450例。在病例选择时应考虑到地域性的差别,应涵盖不少于10例D基因型,应注重不同药物治疗的乙型肝炎患者。阳性样本应覆盖试剂线性范围,均匀分布高、中、低值。建议选择不少于50例的阴性样本进行比对试验,阴性样本主要考虑可能存在的交叉反应情况,应选择其他类肝炎病毒感染、其他良性或恶性肝脏疾病患者,以从临床角度考察其特异性。

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。对于同时能够检测血清和血浆样本的试剂,应对至少50例同一乙型肝炎患者分别采集的血清和血浆样本进行比对试验研究,阳性样本应包括强、中、弱阳性及部分阴性样本。

临床研究应以新鲜样本为主,如采用库存样本应另行说明。

## 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,对于本类产品对比实验的等效性研究,常用相关性、线性回归对 $\log_{10}$ 滴度结果进行统计分析,考察两组数据之间是否存在相关性,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,即评价考核试剂与对比试剂是否等效的标准。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,对检验结果进行符合率分析,计算阳性符合率、阴性符合率和总符合率。

## 6. 结果差异样本的验证

在数据收集过程中,对于两种试剂的检测结果有不一致(检测结果差异较大)的样本,应采用临床上公认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。

## 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》(国食药监械〔2007〕

240 号) 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 申报试剂和对比试剂的名称、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、不同基因型分布情况进行总合, 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、仪器校准、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 两组数据结果的相关性、线性回归的结果。

③ 对相关性及线性方程的显著性检验, 验证两种试剂定量结果的一致性。

④ 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。

⑤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。

另外考虑到对不同样本类型的检测结果可能存在一定差异，故建议对不同样本类型分别进行统计分析，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

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. 李金明，《实时荧光 PCR 技术》，第一版，人民军医出版社，2007。

5. 《中国生物制品规程》(2000年版)，化学工业出版社。

6. 庄辉，乙型肝炎流行病学研究进展，中国医学前沿杂志 2009 年第 1 卷第 2 期。

7. 中华医学会肝病学会，中华医学会感染病学分会，慢性乙型肝炎防治指南 (2010 年版)，《中国医学前沿杂志 (电子版)》2011 年第 3 卷第 1 期。

8. 黄留玉,《PCR 最新技术原理、方法及应用》,化学工业出版社。
9. 樊绮诗,吕建新,《分子生物学检验技术》,人民卫生出版社。
10. 封波,慢性乙型肝炎抗病毒治疗研究进展-来自 2010 年美国肝病学会年会的报告,《中国医学前沿杂志(电子版)》2011 年第 3 卷第 1 期。
11. Nucleic Acid Based In Vitro Diagnostic Devices for Detection of Microbial Pathogens. CDRH, FDA, USA December 8, 2005。