**流行性感冒病毒抗原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）抗原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抗原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**　　流感病毒抗原检测试剂是指利用胶体金法、酶联免疫法等基于抗原抗体反应原理，以特定的流感病毒抗原为检测目标，直接对人咽拭子、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）。在甲型流感病毒中，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，这种抗原性的转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。流感病毒抗原检测试剂可用于流感的辅助诊断，甲型流感病毒各亚型的抗原类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。
　　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，下面对流感病毒抗原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）试剂盒用于体外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抗原（如核蛋白抗原），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，如病毒生物学性状、感染后的临床表现、亚型、变异特征等。
　　（3）待测人群特征介绍：如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。
　　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、灭活方法及无传染性确认的方法等。
　　（2）建议对用于单克隆或多克隆抗体研发的流感病毒株的信息进行简单介绍。
　　（3）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.【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。
　　胶体金试纸条产品应对开封后未使用产品允许暴露于空气中的温度、湿度及期限等条件予以明确。
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）对采样拭子及样本保存液的要求：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：样本类型、具体采集部位，医护人员防护等信息；详述具体的操作方法或列出相关操作指南文件（最好能够给出具体图示）以指导使用者，尽量减少由于样本采集或处理不当对实验结果造成的影响。
　　（4）样本处理及保存：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。
　　5.【检验方法】  详细说明试验操作的各个步骤，包括：
　　（1）实验环境：温、湿度条件，检测试剂及样本复温等要求。
　　（2）试剂配制方法、注意事项，试剂条（卡）开封后注意事项等。
　　（3）试剂条和试剂卡的加样方法如有差异，建议分别以图示方式描述清楚。
　　6.【检验结果的解释】
　　应以图示方法给出阴性、阳性及无效结果的判读示例。
　　7.【检验方法局限性】至少应包括以下内容：
　　（1）本试剂盒的检测结果仅供临床医生参考，不得作为临床诊治的唯一依据，对患者的临床管理应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
　　（2）受抗原类检测试剂方法学的限制，其最低检测限（分析灵敏度）普遍较核酸类试剂低，故实验人员应对阴性结果给予更多的关注，需结合其他检测结果综合判断，建议对有疑问的阴性结果采用核酸检测或病毒分离培养鉴定方法进行复核。
　　（3）如果申报试剂用于甲型流感病毒的检测，应对阳性实验结果做以下建议：建议进一步实验以确认甲型流感病毒的亚型，并向当地公共卫生预防机构咨询协商处理。
　　（4）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病毒基因变异可能导致抗原决定簇的改变，从而造成假阴性结果，使用单克隆抗体的试剂更易发生此类情况。
　　③对于突发的新型甲型流感病毒，其检测的最适样本类型以及感染后的最佳采样时间（病毒滴度峰值）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。
　　④未经验证的其他干扰因素，如……等可能会导致假阴性结果（如有）。
　　8.【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）对于甲型流感病毒抗原（通用型）检测试剂，应首先说明有关其性能指标确定的病毒亚型基础以及有关新型甲型流感病毒的警示，如：以下性能指标基于季节性A/H1和A/H3亚型确认，当其他新型甲型流感病毒出现时，其相关的性能指标可能有所改变。
　　（3）甲型流感病毒抗原（通用型）各亚型验证：用于甲型流感病毒（通用型）抗原的检测试剂，应在此列出所有验证过的各亚型病毒株的信息。
　　（4）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。
　　（5）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。
　　（6）精密度：精密度参考品的组分、浓度及评价标准。
　　（7）分析特异性
　　①用于甲型流感病毒各亚型（HA和/或NA抗原）检测的试剂盒，应对除待测亚型外的其他常见亚型进行交叉反应的验证并说明详细情况。
　　②交叉反应：易产生交叉反应的除待测抗原外的其他病原体的验证情况。
　　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，如未进行相关研究也应提供相关警示说明。
　　（8）钩状（HOOK）效应：出现钩状效应时的流感病毒抗原最低浓度或经验证的未出现钩状效应的最高浓度值。
　　（9）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。
　　9.【注意事项】应至少包括以下内容：
　　（1）与成人相比，儿童更容易在较大范围内传播病毒，且持续时间更长，因此，对儿童检测的敏感性可能高于成人。
　　（2）对于甲型流感病毒或各亚型的检测试剂，当所用抗体为单克隆性质时，则由于核苷酸序列小范围突变导致的抗原表位的微小变化可能会导致假阴性结果或试剂的分析灵敏度降低。
　　（3）有关人源组分（如有）的警告，如：试剂盒内对照品（质控品）或其他组分含有人源物质，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。
　　（4）有关实验操作、样本保存及处理、新型甲型流感病毒验证等其他注意事项。
　　（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。
　　流感病毒抗原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。阳性参考品主要考察对不同来源的病毒株、不同滴度情况下的检测符合性，对于甲型流感病毒抗原通用型检测试剂，在此还应考虑不同亚型的检测能力。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。对于已经有国家参考品的流感病毒项目，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，生产企业应建立自己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.试剂盒所用抗体的制备、筛选、纯化以及鉴定等详细试验资料。如抗体为申请人自制，则应详述抗体的名称及生物学来源（免疫刺激毒株信息），申请人对该抗体技术指标的要求（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；如抗体为申请人外购，则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。
　　2.其他主要原辅料的选择及验证资料，如包被板、硝酸纤维素膜、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。
　　3.企业内部参考品的原料选择、制备、定值过程及试验资料。
　　（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.抗体包被工艺研究，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.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。
　　5.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物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物质或处理方法。
　　（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。对于流感病毒抗原类定性检测试剂，建议着重对以下分析性能进行研究。
　　1.甲型流感病毒不同亚型的差异考虑
　　目前，绝大多数已获上市批准的甲型流感病毒抗原类检测产品均是以核蛋白（nucleoprotein antigen，NP）为检测靶点，理论而言，这些试剂对所有HA和/或NA亚型应具有相同的检测性能。然而，由于不同的病毒株在组织亲和力、繁殖代谢特征、人群选择性、时间地域特征以及检测试剂的抗体特异性等方面具有较大差异，故甲型流感病毒抗原检测试剂对不同的甲型亚型病毒或同一亚型的具有明显时间、地域差异性的不同病毒株在检测性能方面亦具有一定差异。甲型流感病毒抗原检测试剂在进行分析性能研究时应考虑到不同病毒株的这种特性，分别选择多个亚型的代表性病毒株进行性能验证，并在产品说明书中对已予以验证的亚型或病毒株进行说明。
　　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，每份稀释液重复检测不少于20次，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）或空斑形成单位（plaque forming units，PFU）法进行病毒滴度的滴定，并采用上述两种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的每个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多样性的至少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用于流感病毒抗原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：抗原结构的同源性、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。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。
　　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申请人应提交所有用于交叉反应验证的病原体来源、种属/型别和浓度确认等信息。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型类型 |
| 腺病毒 | 7型类型 |
| 人冠状病毒类型 |   |
| 巨细胞病毒类型 |   |
| 肠道病毒类型 |   |
| 人副流感病毒 | 1、2、3型类型 |
| 麻疹病毒类型 |   |
| 人偏肺病毒类型 |   |
| 流行性腮腺炎病毒类型 |   |
| 呼吸道合胞病毒 | B型类型 |
| 鼻病毒 | 1A型类型 |
| 百日咳杆菌类型 |   |
| 肺炎衣原体类型 |   |
| 棒状杆菌\*类型 |   |
| 大肠杆菌\*类型 |   |
| 流感嗜血杆菌类型 |   |
| 乳杆菌\*类型 |   |
| 卡他莫拉菌\*类型 |   |
| 无毒结核分枝杆菌类型 |   |
| 肺炎支原体类型 |   |
| 脑膜炎奈瑟菌类型 |   |
| 淋球菌\*类型 |   |
| 铜绿假单胞菌\*类型 |   |
| 金黄色葡萄球菌类型 |   |
| 表皮葡萄球菌\*类型 |   |
| 肺炎链球菌类型 |   |
| 化脓链球菌类型 |   |
| 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，建议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美国临床和实验室标准协会（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，还应对操作者、实验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。
　　6.钩状（HOOK）效应
　　目前，流行性感冒病毒抗原检测试剂大多采用夹心法的原理检测样本，考虑到方法学的缺陷，有必要对钩状效应进行考虑。建议采用高浓度的流感病毒抗原参考品进行梯度稀释后由低浓度至高浓度开始检测，每个梯度的病毒稀释液重复3～5份，将显色深度随浓度升高反而变浅时的浓度作为出现钩状效应时流感病毒抗原的最低浓度，建议产品说明书上明示包被的抗体浓度和出现钩状效应时流感病毒抗原的最低浓度。
　　（八）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3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。
　　考虑到低温条件下长时间保存可能造成病毒抗原性丢失或减弱，申请人应对样本稳定性进行合理的验证，主要是对冷藏和冷冻两种条件下的有效期进行验证，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。需要冷冻保存的样本应对冻融次数进行合理的验证。
　　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。
　　（九）临床试验资料
　　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或临床预期用途相似的流感病毒核酸检测试剂作为参比试剂，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。
　　另外，对于已获上市批准的甲型流感病毒抗原（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、病毒分离培养鉴定方法或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，则应采用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。企业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抗原（Hn或Nn抗原）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抗原检测的特异性。
　　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、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）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定性结果的一致性分析
　　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。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：**　　14.《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
　　15.《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
　　16.《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
　　17.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.
　　18.In Vitro Diagnostic Devices to Detect Influenza A Viruses: Labeling and Regulatory Path, CDRH FDA, USA May 1, 2007.
　　19.彭文伟，《传染病学》，第五版，人民卫生出版社，2001。
　　20.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。
　　21.陈敬贤，《诊断病毒学》，第一版，人民卫生出版社，2008年4月。
　　22.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