碱性磷酸酶检测试剂注册审查指导原则

（2023年修订版）（征求意见稿）

本指导原则旨在指导注册申请人对碱性磷酸酶（alkaline phosphatase，ALP）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审评注册申报资料提供参考。

本指导原则是对碱性磷酸酶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。

本指导原则是供注册申请人和技术审评人员使用的指导文件，不涉及注册审批等行政事项，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指导原则。如有能够满足法规要求的其他方法，也可以采用，但应提供详细的研究资料和验证资料。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、标准体系及当前认知水平下制定的，随着法规、标准体系的不断完善和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。

一、适用范围

本指导原则适用于以分光光度法为基本原理对人血清或血浆中碱性磷酸酶活性进行体外定量分析的试剂。

从方法学考虑，本指导原则主要指以碱性磷酸酶水解底物引起特定产物的吸光度的改变，对碱性磷酸酶活性进行定量检测的体外诊断试剂，不包括干化学、酶联免疫及金标类检测试剂。

1. 注册审查要点

注册申报资料的撰写应符合《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》的相关要求。

（一）监管信息

1.产品名称

产品名称一般由三部分组成。第一部分：被测物质名称，如碱性磷酸酶；第二部分：用途，如测定试剂盒；第三部分：方法或者原理，如NPP底物-AMP缓冲液法等，本部分应当在括号中列出。

2.分类依据

根据2013版《体外诊断试剂分类子目录》，碱性磷酸酶检测试剂产品类别为：Ⅱ-4 用于酶类检测的试剂，管理类别为二类，分类编码为6840。

3.注册单元划分

按照《医疗器械注册单元划分指导原则》对注册单元划分。如包含不同的包装规格，不同规格间仅试剂组分装量或检测数有差异，原则上划分为同一注册单元；如包含不同的包装规格，不同规格间除试剂装量或检测数的差异外，适用于不同的仪器机型，原则上划分为同一注册单元。校准品、质控品可以与配合使用的碱性磷酸酶检测试剂合并申请注册，也可以单独申请注册。

4.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

主要包括产品描述、预期用途、申报产品上市历史等内容。其中，需注意以下内容：

1.产品描述

1.1产品综述

描述产品所采用的技术原理，产品组成，原材料的来源及制备方法，主要生产工艺，检验方法，校准品（如有）的制备方法及溯源情况，质控品（如有）的制备方法及赋值情况等。

1.2与同类和/或前代产品的比较

应着重从预期用途、主要组成成分、溯源、主要性能指标、参考区间等方面写明拟申报产品与境内、外已上市同类产品和/或前代产品之间的主要区别。

2.预期用途

产品用于体外定量检测人体样本中的碱性磷酸酶的活性。应明确具体的样本类型如血清、血浆等，适用的样本类型应结合实际的分析性能研究及临床研究情况进行确认。应明确适用仪器及使用方法（自动/半自动），样本采集及保存装置和/或添加剂（如抗凝剂）使用情况。

应当明确产品预期使用者（专业或非专业）和预期使用环境（地点及环境条件等）。

（三）非临床资料

1.产品风险管理资料

应符合GB/T 42062 《医疗器械风险管理对医疗器械的应用》的要求。申请人应考虑产品寿命周期的各个环节，从产品设计开发、原材料的采购控制、生产、预期用途、可能的使用错误、与安全性有关的特征、已知和可预见的危害等方面的判定以及对患者风险的估计进行风险分析、风险评价和相应的风险控制基础上，综合评价产品风险可接受程度，形成风险管理资料。

风险分析应包含但不仅限于以下方面的内容：预期用途错误包括：设计开始时未设定预期分析物、未作适用机型验证、未针对特定的样本类型验证。性能特征失效包括：精密度失效、准确度失效、非特异性、稳定性失效、测量范围失效、定性/定量失效、量值溯源失效、校准失效。不正确的结果包括：配方错误、采购的原料未能达到设计要求的性能、原材料储存条件不正确、使用了过期的原材料、反应体系不正确、试剂与包装材料不相容。可能的使用错误包括：生产者未按照生产流程操作，检验者未按照原料、半成品、成品检验标准操作，装配过程组份、标签、说明书等漏装或误装，成品储存或运输不当，客户未参照产品说明书设置参数或使用。与安全性有关的特征包括：有毒化学试剂的化学污染、样本的潜在生物污染、不可回收包装或塑料的环境污染。

2.体外诊断试剂安全和性能基本原则清单

说明产品符合《体外诊断试剂安全和性能基本原则清单》各项适用要求所采用的方法，以及证明其符合性的文件。对于其中不适用的各项要求，应当说明理由。

对于包含在产品注册申报资料中的文件，应当说明其在申报资料中的具体位置；对于未包含在产品注册申报资料中的文件，应当注明该证据文件名称及其在质量管理体系文件中的编号以备查。

3.产品技术要求及检验报告

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、前期临床评价等结果、国家标准、行业标准及有关文献，按照《国家药监局关于发布医疗器械产品技术要求编写指导原则的通告》的有关要求，进行产品技术要求编写。明确保证产品安全、有效、质量可控的各项性能指标和检验方法。

3.1适用的产品标准

产品应当符合适用的强制性标准。对于强制性行业标准，若申报产品结构特征、技术原理、预期用途、使用方式等与强制性标准的适用范围不一致，申请人应当提出不适用强制性标准的说明，并提供经验证的证明性资料。

3.2.产品技术要求

3.2.1主要性能指标

该产品作为定量检测试剂主要包括以下性能指标：试剂的外观、装量、空白吸光度、空白吸光度变化率、分析灵敏度、线性区间、精密度、准确度等，校准品的均匀性等，质控品的均匀性等。产品技术要求应不低于YY/T 1234《碱性磷酸酶测定试剂（盒）（NPP底物-AMP缓冲液法）》、YY/T 1549《生化分析仪用校准物》、YY/T 1662《生化分析仪用质控物》的要求 。

具体产品的性能指标需结合方法学本身特性，确定其性能指标或者提供此指标不适用的说明。

3.2.2检验方法

产品的检验方法需根据技术性能指标设定，检验方法需优先采用公认的或已颁布的标准检验方法；自建检验方法需提供相应的方法学依据及理论基础，同时保证检验方法具有可操作性和可重现性，必要时可附相应图示进行说明，文本较大的可以附录形式提供。

3.3产品检验报告

在保证产品原材料和生产工艺稳定可靠的基础上，采用在符合医疗器械质量管理体系相关要求的条件下生产的产品进行检验。碱性磷酸酶产品目前尚无国家标准品、参考品，如果申报试剂今后有适用的国家标准品、参考品发布，应当使用国家标准品、参考品对产品进行检验。可提交以下任一形式的检验报告：

3.3.1申请人出具的自检报告。

3.3.2委托有资质的医疗器械检验机构出具的检验报告。

如产品提交自检报告，还需按照《医疗器械注册自检管理规定》的要求提交相应资料。

4.分析性能研究

分析性能研究资料应符合《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》的相关要求。分析性能研究的试验方法，可以参考《定量检测体外诊断试剂分析性能评估注册审查指导原则》进行。

4.1样本稳定性

申请人应充分考虑实际使用过程中样本采集、处理、运输及保存等各个阶段的条件，对不同类型样本的稳定性分别进行评价并提交研究资料。内容包括建议的保存条件（如温度范围、是否需要避光等）、允许的冻融周期、添加剂（如抗凝剂）和运输条件(如涉及）等。样本稳定性内容的研究结果应在说明书【样本要求】中进行详细说明。

4.2适用的样本类型

如申报产品适用于血清和血浆，可采用一定数量血清、血浆同源样本进行对比试验的方法，证明不同样本类型是否可比。如果选择具有代表性的样本类型代替其他可比的样本类型进行分析性能评估，应说明原因并提供证据支持。

4.3校准品的量值溯源和质控品的赋值

申请人应明确申报产品适用的校准品和质控品。申请人应提供试剂配套校准品量值溯源相关资料，提供质控品赋值及其质控范围确定的相关资料。

可参照GB/T 21415《体外诊断医疗器械 生物样品中量的测量 校准品和控制物质赋值的计量学溯源性》、YY/T 1709《体外诊断试剂用校准物测量不确定度评定》、YY/T 1549《生化分析仪用校准物》的要求，提供校准品溯源以及校准品定值及不确定度计算的相关资料。可参照YY/T 1662《生化分析仪用质控物》、《质控品注册审查指导原则——质控品赋值研究》的要求，提供质控品的赋值资料。

如校准品/质控品的基质不同于临床常用样本类型，还应提交基质效应的相关研究资料。

4.4正确度

正确度（trueness）指大量重复测量所得量值的平均值与一个参考量值间的一致程度。正确度由系统测量误差决定，通常用偏倚表示。对测量正确度的评价方法包括：使用参考物质的偏差分析、方法学比对等方法，申请人可根据实际情况选择合理方法进行研究。

4.4.1使用参考物质的正确度评价

采用至少两个浓度的参考物质，代表临床意义相关的高、低浓度水平，进行相对偏差分析。如参考物质只有一个水平，且无合理稀释方法，亦可在说明原因的基础上，仅采用一个水平的参考物质进行正确度评价，结果应在申请人给定范围内。

4.4.2方法学比对

采用申报试剂与合理的比较测量程序同时检测临床样本，通过两者的比对研究和偏倚估计，进行申报试剂的正确度评价。比较测量程序可选择同类试剂或者参考测量程序。临床样本的浓度水平应覆盖申报试剂的测量区间。在性能建立时，建议对每个样本重复检测，以平均值或中位数进行回归分析，并评价医学决定水平或参考区间上/下限浓度的偏倚。

在实施方法学比对前，应分别对拟申报试剂和比较测量程序进行初步评估，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。

4.5精密度

精密度由随机测量误差决定，通常用标准差、方差或变异系数表示。精密度一般包括重复性、中间精密度和再现性。应考虑运行、时间、操作者、测量仪器、测量程序、试剂批次、校准品、地点、环境条件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。样本浓度一般包括测量区间高、中、低在内的3～5个水平，应有医学决定水平或参考区间上/下限浓度附近的样本

4.6空白限、检出限及定量限

申请人可根据产品的具体情况选择适用的方法进行检出能力的研究，建议对空白限（LoB）、检出限（LoD）、定量限（LoQ）进行评估并提交研究资料。可参照《定量检测体外诊断试剂分析性能评估注册审查指导原则》，提供空白限、检出限与定量限的建立及验证的研究资料。

4.7分析灵敏度

试剂盒测试给定浓度的被测物时，吸光度差值（ΔA）应符合申请人给定范围。

4.8分析特异性

应评估分析待测样本中和试剂使用过程中潜在的交叉反应和干扰物质，并对干扰和交叉的程度进行量化。

应充分考虑干扰物质对检测结果的影响，并结合实际情况选择适用的干扰物质进行评价。

常见的干扰物质包括但不限于胆红素、血红蛋白、甘油三酯、胆固醇、类风湿因子、样本添加剂（抗凝剂或防腐剂）、抗坏血酸、常用药物及其代谢物及膳食物质等，亦应考虑文献中已报道的对类似试剂或测量程序存在干扰的物质。

干扰物浓度的分布应覆盖人体生理及病理状态下可能出现的物质浓度。待评价的碱性磷酸酶样本浓度至少应为高、中、低三个水平，选取线性范围内有临床代表性意义的浓度。

4.9线性区间、测量区间及可报告区间

申请人应评估申报产品的线性区间、测量区间及可报告区间并提交研究资料。

4.9.1 线性区间

线性区间的研究，需采用高值和零浓度/低值浓度的样本按比例精确配制的一系列不同浓度的样本。线性区间建立时，需配制出较预期线性区间更宽的至少9个左右不同浓度的样本（不包括零浓度样本），每个样本进行多次重复检测，根据可接受线性偏差和各浓度的重复性，确定检测次数。采用重复检测均值和预期值进行直线回归分析，建议采用加权最小二乘回归等分析方法，提供散点图、线性回归方程、线性相关系数（r）及线性偏差，判断结果是否满足可接受标准。

验证线性区间时，可将接近线性区间上限的高值样本按一定比例稀释至少为5个不同浓度，每一浓度的样本至少重复测定2次，计算其平均值，求出线性方程。

4.9.2测量区间及可报告区间

测量区间，也称分析测量区间，在该区间内，临床样本在未经稀释、浓缩，或非常规测量程序中步骤的其他前处理情况下，检测结果的线性偏差、不精密度和偏倚均在可接受范围内。测量区间下限为定量限，线性区间包含测量区间。

如对超出线性区间的浓度样本可进行稀释后检测，应研究适用的稀释液和声称的稀释倍数，从而确定试剂的可报告区间。

5.参考区间确定资料

申报产品可以通过建立或验证的方法确定产品的参考区间，可参照《体外诊断试剂参考区间确定注册审查指导原则》的要求进行研究。

无论是建立自己的参考区间或验证参考区间，都要确保参考区间的可溯源性，记录确定参考区间的所有步骤，包括参考个体的选择、分析前因素、样本检测以及统计分析方法等。

6.稳定性研究

主要包括实时稳定性（货架有效期）、使用稳定性以及运输稳定性等。申请人可根据实际需要选择合理的稳定性研究方案，同时应注意选取代表性包装规格进行研究。稳定性研究资料应包括研究方案、研究报告和研究数据。

6.1实时稳定性（货架有效期）

提交至少三批申报产品在实际储存条件下保存至成品有效期后的实时稳定性研究资料。明确储存的环境条件（如温度、湿度和光照）及有效期。

6.2使用稳定性

提交至少一批申报产品实际使用期间稳定性的研究资料，应包括所有组成成分的开封稳定性。适用时提交复溶稳定性、开瓶稳定性及机载稳定性研究资料等。如涉及校准品，还应提交校准频率或校准稳定性研究资料。明确产品使用的温度、湿度条件等。

碱性磷酸酶测定反应在碱性条件下进行，开封试剂可能因吸收空气中的二氧化碳而使pH降低，影响测定结果，应注意开封试剂的使用时间，采用合适的校准计划。

6.3运输稳定性

提交至少一批申报产品在特定或者预期的条件下运输的研究资料，应说明产品正确运输的环境条件（如温度、湿度、光照和机械保护等）。同时说明产品的包装方式以及暴露的最差运输条件。

7.其他资料

7.1反应体系（如需提供）

应包含产品确定反应温度、时间、缓冲体系比较等条件的研究资料、确定样本和试剂盒组分加样量的研究资料。

7.2主要原材料研究资料和生产工艺研究资料（如适用）

主要原材料的研究资料包括主要原材料的来源、选择、制备方法的研究资料，质量分析证书，主要原材料质量标准的制定和检验资料。如适用，提交企业参考品的研究资料，包括来源、组成、阴阳性和/或量值确认等。

生产工艺的研究资料包括工作液的配制、分装和冻干，显色/发光等结果放大系统的确定等。

7.3三批产品的生产及自检记录。

提供三批产品生产及自检记录的复印件。如产品包含校准品和（或）质控品，还应提供校准品的赋值记录和质控品的定值记录

7.4证明产品安全性、有效性的其他非临床研究资料。

（四）临床评价资料

根据体外诊断试剂临床评价的相关要求，申报产品用于肝胆疾病和骨骼疾病的辅助诊断，属于列入《免于临床试验体外诊断试剂目录》的项目，申请人可按照《免于临床试验的体外诊断试剂临床评价技术指导原则》提交临床评价资料。

如申请人申请的产品超出《免于临床试验体外诊断试剂目录》的产品描述的范围，应按照《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》、《医疗器械临床试验质量管理规范》的相关要求提交临床试验资料。

（五）产品说明书和标签样稿

产品说明书和标签应符合《医疗器械说明书和标签管理规定》和《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求。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。产品说明书内容原则上应全部用中文进行表述，如含有国际通用或行业内普遍认可的英文缩写，可用括号在中文后标明；对于确实无适当中文表述的词语，可使用相应英文或其缩写。

下面对碱性磷酸酶检测试剂盒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.【产品名称】

试剂（盒）名称由三部分组成：被测物名称、用途、方法或原理。例如：碱性磷酸酶检测试剂盒（NPP底物-AMP缓冲液法）。

2.【包装规格】

应注明可测试的样本数或装量，如××测试/盒、××人份/盒、××mL，除国际通用计量单位外，其余内容均应用中文进行表述。

3.【预期用途】

第一段明确试剂盒用于体外定量检测血清或血浆等人体样本中碱性磷酸酶的活性。第二段简要说明与预期用途相关的临床适应证及背景情况。说明相关的临床或实验室诊断方法。

4.【检验原理】

应结合产品主要成分简要说明检验的原理、方法，必要时可采取图示方法表示，检测原理的描述应结合产品主要组成成分、被测物和产物的关系进行描述：

如：本产品以磷酸对硝基苯酚（4-NPP）为底物，2-氨基-2-甲基-1-丙醇（AMP）为磷酸酰基受体物质，增进酶反应速率，在碱性磷酸酶（ALP）催化下，4-NPP分裂出磷酸基团，生成游离的对硝基苯酚（4-NP），后者在碱性溶液中转变成醌式结构，呈现较深的黄色。反应式如下：

磷酸对硝基苯酚+H2O4-对硝基苯酚+磷酸盐

磷酸对硝基苯酚+AMP4-对硝基苯酚+AMP-磷酸盐

由于反应中4-NP的生成速率与ALP活性呈正比，因此在37℃、405nm波长下监测吸光度上升速率，可得出ALP的活性。

5.【主要组成成分】

5.1对于产品中包含的试剂组分，说明各组分的名称、数量、装量。说明各组分中的核心反应成分、显色/发光物质、缓冲液基质、防腐剂。抗原/抗体等生物活性材料应提供其生物学来源、活性及其他特性。多组分试剂盒应明确说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换(如适用)。

5.2.需要但未提供的试剂。对于产品中不包含，但对该试验必需的试剂如单独注册的校准品/质控品、样本保存液等应列出各组分的名称、生产商及其注册证号或备案号。

5.3.对于校准品和质控品，应说明核心反应成分及其生物学来源，明确缓冲液基质。注明校准品的定值及其溯源性。注明质控品的靶值、靶值范围和计算方法。若校准品或质控品的值为批特异，可注明批特异，并附单独的靶值单。

6.【储存条件及有效期】

6.1对产品的效期稳定性、开封稳定性（如开封保存条件、保存时长、冻融次数等）、复溶稳定性（如适用）等信息作详细介绍，包括环境温度、避光条件等。保存温度不应有模糊表述，如“常温”“室温”，应直接以℃为单位

6.2不同组分保存条件及有效期不同时，应分别说明。产品有效期以其中效期最短的为准。

6.3生产日期、使用期限或失效日期（可见标签）。

7.【适用仪器】

注明所适用的仪器类型，应细化到具体厂家、型号。

8.【样本要求】

应明确以下内容：

8.1样本类型：明确适用的样本类型，应注明对抗凝剂的要求（如草酸盐、柠檬酸盐、EDTA钠盐对碱性磷酸酶活性造成干扰，应明确避免使用的提示）。说明已知的干扰物质，同时列出干扰物的具体浓度。

8.2样本稳定性：明确样本采集后和处理后的保存条件和期限等。冷藏/冷冻样本检测前是否需恢复至室温、冻融次数的要求。以上内容应与样本稳定性的研究结果一致。

9.【检验方法】

详细说明试验操作的各个步骤，包括：

9.1试剂配制方法、注意事项；

9.2试验条件：温度、时间、测定主/副波长、试剂用量、样本用量、测定方法、反应类型、反应方向、反应时间等以及试验过程中的注意事项；

9.3校准程序：校准品的使用方法、注意事项、校准曲线的绘制。

9.4质量控制程序：质控品的使用方法、对质控结果的必要解释以及推荐的质控周期等；建议在本部分注明以下字样：如果质控结果与预期不符，提示检测结果不可靠，不应出具检测报告。

9.5检验结果的计算：应明确检验结果的计算方法。超出线性范围的样本如进行稀释，应结合可报告范围研究结果明确稀释液类型和最大可稀释比例。

10.【参考区间】

明确参考区间，并简要说明建立和验证参考区间的基本信息，包括：样本量、人群特征（如性别、年龄、种族等）和采用的统计学方法。

建议注明“由于地理、人种、性别和年龄等差异，建议各实验室建立自己的参考范围”。

11.【检验结果的解释】

依据其临床意义对检测结果进行解释说明，必要时可采用图示的方法进行说明。说明在何种情况下需要进行复测或确认试验（如需要）。说明可能对试验结果产生影响的因素。

若超过线性区间上限的高浓度样本可稀释后测定，则应说明样本的最大可稀释倍数、稀释溶液等信息。

12.【检验方法的局限性】

说明该检验方法的局限性。如该试剂盒的检测结果仅供临床参考，不能单独作为临床诊治的依据，应结合患者性别、年龄、病史及其他实验室指标等信息综合考虑。当检验结果出现与临床不符甚至相悖的情况，应分析查找原因并重新确认等。

说明其他可能存在的问题 。

13.【产品性能指标】

产品性能指标应:概括描述每项分析性能研究如准确度、精密度、灵敏度、线性区间、分析特异性等适用项目的研究方法和结果。概括描述临床评价包括免于临床试验的临床评价和临床试验的方法和结果。

14.【注意事项】

建议包括以下内容：

14.1产品仅用于体外诊断，试剂中含有的化学成分接触人体后是否会产生不良的影响后果。

14.2如无确切的证据证明其安全性，对所有样本和反应废弃物都应视为传染源对待，提示操作者采取必要的防护措施。若试剂组分中，如质控品、校准品等含有人源物质的组分，这些组分亦应该被视为传染源对待；对于动物源性组分，应给出具有潜在感染性的警告。

14.3采用不同方法学的试剂检测所得结果不应直接相互比较，以免造成错误的医学解释；建议实验室在发给临床医生的检测报告注明所用试剂特征。

14.4其他有关碱性磷酸酶测定的注意事项。

15.【标识的解释】

说明书和标签中如有图形或符号，请解释其代表的意义。

（六）质量管理体系文件

主要包括综述、生产制造信息、质量管理体系程序、管理职责程序、资源管理程序、产品实现程序、质量管理体系的测量、分析和改进程序、其他质量体系程序信息以及质量管理体系核查文件等。

三、参考文献

[1] 尚红,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程（第4版）[M].北京:人民卫生出版社,2015.

[2]《体外诊断试剂注册与备案管理办法》

[3]《定量检测体外诊断试剂分析性能评估注册审查指导原则》[Z].

[4]《体外诊断试剂参考区间确定注册审查指导原则》[Z].

[5]《体外诊断试剂说明书编写指导原则》[Z].

[6]《医疗器械产品技术要求编写指导原则》[Z].

[7]《体外诊断试剂参考区间确定注册审查指导原则》[Z].

四、编写单位

山东省食品药品审评查验中心