

[J]. 中国小儿血液与肿瘤杂志,2014,19(3):134-137.

[8] 刘晓红. 小儿左侧睾丸畸胎瘤 1 例[J]. 中外健康文摘, 2009,6(31):69.

[9] 张贤生,杨佳佳,高晶晶,等. 新生儿睾丸畸胎瘤 3 例报告并文献分析[J]. 临床泌尿外科杂志,2013,28(2):154-156.

• 短篇及病例报道 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.26.049

[10] 刘宏科,王晓鹰,贾文娟,等. 超声诊断胎儿未成熟畸胎瘤 1 例[J]. 中华超声影像学杂志,2008,17(7):623.

(收稿日期:2016-02-20 修回日期:2016-04-06)

解析新发突发传染病产品应急审评中性能评估和临床试验的基本要求

董劲春

(国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心,北京 100044)

[中图分类号] R373.1

[文献标识码] C

[文章编号] 1671-8348(2016)26-3741-02

近年来,全球频发新发突发的传染病疫情,从 2009 年的新型甲型 H1N1 流感病毒暴发流行,到 2013 年人感染 H7N9 禽流感病毒暴发流行,2014 年暴发的埃博拉病毒出血热疫情,2015 年暴发的中东呼吸综合征疫情,2016 年暴发的寨卡病毒疫情,为应对不同时期境内外暴发的各种传染病疫情,做好体外诊断试剂应急储备工作,国家开设了病原体核酸检测产品的应急审评。作为国家药监总局医疗器械技术审评中心审评员,作者下面就应急审评方案中的性能评估和临床试验的基本要求进行分析介绍。

1 性能评估的基本要求

1.1 所有病原体均应完成的性能评价

1.1.1 核酸(RNA)提取/纯化性能 在进行靶核酸检测前,应有适当的 RNA 提取/纯化步骤。该步骤的目的除最大量分离出目的 RNA 外,还应有相应的纯化作用,尽可能去除 PCR 抑制物。无论检测试剂是否含有 RNA 分离/纯化的组分,企业都应结合检测试剂的特性,对配合使用的 RNA 提取试剂/方法的提取效率、提取 RNA 纯度等做充分的验证,提供详细的验证资料。如果申请的试剂产品无需进行 RNA 提取/纯化,应进行详细的说明并提供详细的验证资料,以明确产品不进行 RNA 的提取/纯化也可以达到很好的检测效果,且应与需进行 RNA 提取/纯化的质量较好的试剂产品进行充分、详细的比对试验。

1.1.2 最低检测限

1.1.2.1 最低检测限的确定 将含有病原体目的 RNA 片段的假病毒颗粒(不同基因型)梯度稀释于(与适用样本一致的)适当基质中,用于进行最低检测限研究,建议采用质粒或其他适宜的方法标定假病毒原液的滴度。每个浓度梯度最少重复 3 次检测,以 100%可检出的最低浓度水平作为估计检测限,在此浓度附近制备若干梯度浓度样品,每个浓度至少重复 20 次检测,将具有 90%~95%阳性检出率的最低浓度水平作为确定的最低检测限<sup>[1-3]</sup>。提供详细的假病毒浓度滴定方法,试验数据。

1.1.2.2 最低检测限的验证 采用假病毒在最低检测限浓度水平进行验证。应达到 90%~95%阳性检出率。最低检测限的确定和验证均应考虑不同病原体的基因型特点和具有时间和区域特征性的不同病毒株,原则上应包括可检出的所有基因型以及每个基因型至少具有代表性的 3 个毒株分别进行最低检测限的确定和验证。以上最低检测限评价采用的是企业自

行合成的假病毒,应详细提供假病毒不同基因型、不同毒株的制备方法,明确基因序列。

1.1.3 病原体 RNA 阳性检出能力验证 采用病毒检测目的基因的体外转录全长 RNA 进行检出能力验证,针对预期用途包含的每种病毒型别,均应选择 NCBI 上已登录毒株中至少 3 个不同病毒株的基因序列分别完成此项验证,每个病毒株至少设置三个浓度水平的 RNA 样品,其中包含最低检测限附近水平的样品,建议样品基质与预期适用样本类型一致。以试剂盒检测上述样品,考察病毒核酸检测试剂的检出能力,提交相关研究资料,包括样本制备方法、滴度确定方法、验证试验结果等。

1.1.4 分析特异性

1.1.4.1 交叉反应 用于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。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<sup>6</sup> cfu/mL 或更高,病毒为 10<sup>5</sup> pfu/mL 或更高。除特别说明外,应尽量采用灭活的临床样本,或添加了灭活病原体培养物的阴性临床样本,样本基质应与预期检测样本类型一致。如病原体培养物不能符合如上要求,企业应详细说明理由。交叉反应的病原体一般包括各种 RNA 病毒,如流行性感冒病毒、HIV、丙型肝炎病毒、肠道病毒等;细菌一般包括伤寒杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、铜绿假单胞菌等;其他病原体如肺炎支原体、腺病毒、乙型肝炎病毒等;还应包括人类基因组 DNA。同时还应考虑不同病原体的各自特点,选择交叉反应的病原体种类,以充分反映产品检测的特异性。如 H7N9 病毒应选择新型 H1N1 流感病毒、H5N1 流感病毒、H3N2 流感病毒,埃博拉病毒选择马尔堡病毒、登革热病毒、新型布尼亚病毒、汉坦病毒;寨卡病毒选择登革病毒(4 个型别)、基孔肯雅病毒、黄热病毒、乙型脑炎病毒等;中东呼吸综合征冠状病毒选择腺病毒(如 3 型、7 型)、冠状病毒 229E、冠状病毒 OC43、冠状病毒 HKU1、冠状病毒 SARS 等。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/型别信息和浓度确认等试验资料。

1.1.4.2 干扰试验 根据所采集样本类型,进行干扰物质验证。如适用样本包括全血、血清或血浆,则至少应验证血液存在的胆红素、三酰甘油、血红蛋白。如有鼻咽拭子、痰液等还应验证血液、鼻分泌物或黏液等的干扰,同时还应包括患者可

能使用的抗病毒药物等的干扰情况。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。申请人应至少采用两个浓度水平的病毒(假病毒)稀释液进行干扰试验研究,其中应包括最低检测限附近水平。

**1.1.5 精密度** 测量精密度的试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。精密度评价中应考虑检测试剂本身以及其他要素的可能造成的精密度波动,包括 PCR 分析仪、操作者、地点等要素;应设定合理的精密度评价周期,从而对批内/批间、日内/日间精密度进行综合评价;用于精密度评价的质控品应至少包括 3 个水平(阴性、临界阳性和中、强阳性),可采用包含目的 RNA 的假病毒,基质应与适用样本类型一致<sup>[3]</sup>。

**1.2 需采用真实病原体完成的性能评估** 对于埃博拉出血热这样的高病死率传染病,病毒实验操作要求非常高,归为生物安全第 4 级病毒,我国当时并没有一个实验室可以达到病毒培养及实验的要求,因此实际上无法完成真实病毒株的性能验证,所以只能采用企业自行合成的假病毒进行所有性能的验证<sup>[4]</sup>。对于 H7N9 流感病毒、新型甲型 H1N1 流感病毒,由于国内病例较多,企业可以获得真实病毒株,因此需采用病毒株自行进行性能验证,也可委托其他有资质的机构代为完成性能评价。而对于中东呼吸综合征冠状病毒<sup>[5]</sup>、寨卡病毒<sup>[6]</sup>,由于国内病例较少,企业无法获得病毒株,但是中国疾病预防控制中心通过病毒分离培养或向境外购买的方式可以获得病毒株。对于此类病毒,企业需委托中国疾病预防控制中心进行产品部分性能的验证。对于病毒株至少应验证以下性能。

**1.2.1 最低检出限的验证** 应对不同的型别或是境内主要流行的型别分别进行最低检测限的验证,应明确病毒株的确认方法、病毒滴度的确定方法,有条件时应对不同地域流行的主要毒株也进行详细验证。与国家疾病预防控制中心公认的检测方法进行比对时,企业产品的最低检测限应不低于国家疾病预防控制中心公认检测方法的最低检测限。

**1.2.2 重复性** 采用病毒株进行验证,应对高、低两个浓度的样本分别进行验证,其中一个浓度应为最低检出限附近的浓度。

**1.2.3 交叉反应** 对于一些较难获得的交叉反应病原体也可委托国家疾病预防控制中心进行产品性能的验证,如基孔肯雅病毒、黄热病毒、登革病毒等。

**2 临床试验要求**

**2.1 总样本量要求** 应急产品都是全新病原体导致疾病的暴发和流行,因此临床的总样本数均应大于 1 000 例,申请人应按照《体外诊断试剂临床研究技术指导原则》的要求在相应的临床环境中对试剂的临床性能进行系统性研究<sup>[2]</sup>。如检测试剂适用于不同的样本类型,原则上不同的样本类型的病例数之和大于 1 000 例即可,但每种样本类型的病例数不能过少,病例数须差异具有统计学意义。

**2.2 阳性样本量要求**

**2.2.1** 对于境内大范围流行的疾病,阳性病例数不得少于 300 例,如新型甲型 H1N1 流感病毒。

**2.2.2** 如在境内属于散发病例,但病例数相对较多,则至少完

成境内阳性病例数的 50% 以上,如人感染 H7N9 禽流感病毒。

**2.2.3** 如在境内阳性病例数极少,也应至少完成境内阳性病例数的 50% 以上,同时应采用假病毒与临床样本混合的方式进行临床试验,阳性例数应大于 200 例,如中东呼吸综合征病毒。

**2.2.4** 如境内没有阳性病例,应采用假病毒与临床样本混合的方式进行临床试验,阳性例数应大于 200 例。同时如果有条件,可以采用去疫区(境外)检测的方式进行临床试验,阳性病例数也应大于 200 例,如埃博拉病毒。

**2.2.5** 如在境内阳性病例数极少,但灭活的病毒株可以获得,病毒的致病性也较低,除必须至少完成境内阳性病例数的 50% 病例外,还应采用灭活的病毒株与临床样本混合的方式进行临床试验,阳性例数应大于 200 例,如寨卡病毒。

**2.3 阴性样本要求** 对特异性验证所需的阴性样本,应当选择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感染的患者。一般建议考虑有呼吸道疾病、发热、腹泻、出血热等症状的患者,所有样本均应为独立的临床样本。临床数据汇总表应明确临床诊断结果,包括感染病原体名称。以上所有样本编盲后进行 RNA 提取和病毒 RNA 检测,以交叉四格表的形式总结检测结果,并对检测结果进行统计分析,如四格表卡方检验或 kappa 检验。根据以上临床研究结果,对检测试剂的临床性能进行预评价。

总之,由于每种疫情暴发都有自己的特点,如不同的流行传播方式、不同的病原体特点、不同的致病性等。因此应根据不同病原体的特点,分别制定了不同病原体性能评估和临床试验的研究及评价方法,以更科学、更充分的评价核酸检测试剂的基本性能,使其能够适于临床使用,最大程度的减少漏检率和假阳性率。

**参考文献**

[1] 体外诊断试剂注册管理办法. 国家食品药品监督管理总局令 第 5 号[Z],2014.

[2] 李平亮. 体外诊断试剂质量体系中小企业参考品的管理研究[J]. 科技资讯,2013,12:176.

[3] Nucleic Acid Based In Vitro Diagnostic Devices for Detection of Microbial Pathogens, Center for devices and radiological health[Z],2005.

[4] Ebola Z, Rrt-Pcr(taqman®) assay On Abi® 7500 Fast Dx LC, JBAIDS. The naval medical research center for the U [Z],2014.

[5] Corman VM, Olschlagel S, Wendtner CM. Performance and clinical validation of the RealStar MERS-CoV Kit for detection of Middle East respiratory syndrome coronavirus RNA[J]. J Clin Virol,2014,60(2):168-171.

[6] Giovanetti M, Milano T, Alcantara LC. Zika Virus spreading in South America; Evolutionary analysis of emerging neutralizing resistant Phe279Ser strains[J]. Asian Pac J Trop Med,2016,9(5):445-452.