**确定人乳头状瘤病毒检测或检测和区分用体外诊断器械的性能特征**

**行业和美国食品药品监督管理局工作人员指南**

***指南***

**文件发布日期：2017年9月15日**

**文件草案发布日期：2015年8月14日**

**本指南取代了2011年11月28日发布的标题为“人乳头状瘤病毒检测或检测和区分用体外诊断器械性能特征的建立”的FDA指南。**

如对本文件有任何问题，请联系Natalia Comella, Ph.D.，电话：（301）796-6226或发送电子邮件到以下电子邮箱：natalia.comella@fda.hhs.gov或联系 Marina V. Kondratovich, Ph.D.，电话：（301）796-6036或发送电子邮件到以下电子邮箱：marina.kondratovich@fda.hhs.gov。

|  |  |
| --- | --- |
|  | **美国卫生与公众服务部**  **美国食品药品监督管理局**  **医疗器械和放射健康中心**  **体外诊断试剂和放射安全办公室** |

**前言**

**公众意见**

贵司可随时提交电子意见和建议至http://www.regulations.gov，以供FDA考虑。请提交书面意见至美国食品药品监督管理局档案管理工作人员（5630 Fishers Lane, Room 1061, （HFA-305）, Rockville, MD 20852）。使用案卷编号FDA-2009-D-0386标识所有评注。下次修订或更新文件前，FDA可能不会对评论意见采取行动。

**更多副本**

可从互联网获取其他副本。同时，也可发送电子邮件请求至CDRH-Guidance@fda.hhs.gov接收指南副本。请使用文件编号1740识别贵司请求的指南。

**目录**

[I. 前言 5](#_Toc97491060)

[II. 背景 6](#_Toc97491061)

[III. 范围 7](#_Toc97491062)

[IV. 健康风险 7](#_Toc97491063)

[V. 器械描述 8](#_Toc97491064)

[VI. 测试方法 8](#_Toc97491065)

[VII. 确定性能特征 9](#_Toc97491066)

[A. 分析研究 9](#_Toc97491067)

[(1) 检测限 9](#_Toc97491068)

[(2) 精密度 10](#_Toc97491069)

[(3) 交叉反应 13](#_Toc97491070)

[(4) 干扰 15](#_Toc97491071)

[(5) 携带污染和交叉污染研究（适用于带有自动液体处理系统的器械） 16](#_Toc97491072)

[(6) 标本储存和运输条件 16](#_Toc97491073)

[(7) 试剂储存和运输条件 17](#_Toc97491074)

[(8) 临床数据集中HPV检测的评价 17](#_Toc97491075)

[B. 临床性能研究 19](#_Toc97491076)

[(1) 宫颈癌筛查指导原则的考虑事项 19](#_Toc97491077)

[(2) 预期用途 20](#_Toc97491078)

[(3) ASC-US分流、辅助和初步筛查预期用途（以及可能的任何其他预期用途）的共同研究设计考虑事项： 21](#_Toc97491079)

[(4) ASC-US分流预期用途 25](#_Toc97491080)

[(5) ASC-US人群-用于检测和区分的HPV测试（HPV基因分型测试） 28](#_Toc97491081)

[(6) 辅助预期用途 30](#_Toc97491082)

[(7) 辅助预期用途-用于检测和区分的HPV测试（HPV基因分型测试） 32](#_Toc97491083)

[(8) 初步筛查预期用途 33](#_Toc97491084)

[(9) 涵盖所有三项HPV预期用途的研究设计（ASC-US分流、辅助筛查和HPV初步筛查） 35](#_Toc97491085)

[C. 对照 35](#_Toc97491086)

[(1) 外部对照 36](#_Toc97491087)

[(2) 内部对照 36](#_Toc97491088)

[VIII. 参考文献 37](#_Toc97491089)

[IX. 附录 - 统计学分析 40](#_Toc97491090)

**确定人乳头状瘤病毒检测或检测和区分用体外诊断器械的性能特征**

**行业和美国食品药品监督管理局工作人员指南**

***本指南代表美国食品药品监督管理局（FDA）对该主题的当前看法。本文件不赋予任何人任何权利，对FDA或公众不具有约束力。如果替代方法满足适用的情形和法规 的要求，则贵司可使用替代方法。如需讨论替代方法，请联系标题页所列负责本指南的FDA工作人员或办公室。***

# I. 前言

FDA发布这一指南是为了促进研究设计，以确定用于检测或检测和区分人乳头状瘤病毒（HPV）的体外诊断器械（IVD）的性能特征。这些器械与宫颈细胞学联合使用，以帮助筛查宫颈癌或作为一线初步宫颈癌筛查器械。这些器械包括那些检测一组HPV基因型，特别是高危型HPV的器械，以及检测到一种以上HPV基因型并进一步对其进行区分以指示存在哪种HPV基因型的器械。目前已鉴定出约200种HPV基因型，其中约40种可感染生殖道[参考文献1]。感染“高危”型HPV被认为是几乎所有宫颈癌的必然原因[参考文献2]。大约有14种HPV基因型被认为具有致癌性或具有“高风险”[参考文献3和参考文献20]。在本文件的其余部分，除非另有说明，“HPV”指“高危型”HPV。。“高危型HPV检测”指可检测不同类型的HPV但不区分这些类型的HPV IVD器械；而“HPV基因分型测试”指检测并进一步区分HPV类型的HPV IVD器械（一些HPV检测除了提供合并探针的结果外，还提供单独的HPV基因分型结果）。

本指南提供了FDA推荐用于支持这些器械的上市前申请（PMA）的研究类型的详细信息。建议您在开始研究之前联系FDA，讨论针对您的器械的具体研究建议和性能目标。

本指南仅限于旨在确定体外诊断HPV器械的性能特征的研究，这些器械与宫颈细胞学联合用于宫颈癌筛查或作为一线初步宫颈癌筛查器械。本指南专门针对从宫颈标本中定性检测HPV核酸的器械，但许多建议也将适用于检测HPV蛋白的器械。有关本指导文件涵盖内容的更多详细信息，请参见第III部分“范围”。

有关本文件中引用的FDA认可的标准的最新版本，请参见FDA认可的共识标准数据库，网站：

http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfStandards/search.cfm.

FDA指南文件，包括本指南，并未规定具有法律强制力的责任。相反，指南描述了FDA对该主题的当前看法，除非引用了具体监管或法定要求，否则应仅视为建议。FDA指南中使用的“*应该（should）*”一词指建议或推荐进行某一事项，并非强制要求。

# II. 背景

本文件为建立用于检测或检测和区分宫颈标本中的人乳头状瘤病毒的*体外*诊断器械的性能特征提供指导。这些建议适用于HPV IVD的PMA。

拟上市销售用于检测或检测和区分人乳头状瘤病毒的IVD器械的制造商必须符合《联邦食品、药品和化妆品法案》（《FD&C法案》）的要求，并在上市销售该器械之前获得上市前批准（《联邦食品、药品和化妆品法案》第513和515条；21 U.S.C. 360c和360e）。由于HPV诊断器械是修正后器械，根据《联邦食品、药品和化妆品法案》第513（f）（1）条，将其自动归类为III类。根据《联邦食品、药品和化妆品法案》第515条，依据第513（f）（1）条归类为III类的器械需要获得上市前批准。参见《联邦食品、药品和化妆品法案》第515（a）（2）条（要求根据第513（f）条对分类为III类的器械进行上市前批准）；也请参见《联邦食品、药品和化妆品法案》第513（a）（1）（C）条（将III类器械定义为“根据第515条，必须接受上市前批准，以提供对其安全性和有效性的合理保证”）。

有关器械测试的更多信息，可参见FDA指南，标题为“体外诊断器械研究-常见问题”，网站：

（http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071230.pdf）， 以及FDA指南，标题为“体外诊断器械的知情同意书指南-使用无法单独识别出的剩余人体样本进行的研究”，网站：

(http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm071265.pdf).

# III. 范围

本文件为建立用于定性检测或检测和区分HPV的体外诊断器械的性能特征推荐研究。本指南仅限于旨在确定体外诊断HPV器械的性能特征的研究，这些器械与宫颈细胞学联合用于宫颈癌筛查或作为一线初步宫颈癌筛查器械。其没有涉及非宫颈样本样本的HPV检测，如咽部、阴道、阴茎或肛门样本样本，或对HPV感染的灵敏度测试。其没有涉及HPV的定量或半定量分析。

作为修正后器械，根据《联邦食品、药品和化妆品法案》第513（f）（1）条，将HPV诊断器械自动归类为III类器械。到目前为止，已经为HPV核酸检测器械建立了两个产品代码：MAQ（HPV DNA检测器械）和OYB（HPV RNA检测器械）。这两个产品代码都是III类器械。本指南中的建议适用于检测HPV核酸（HPV DNA和RNA）的HPV诊断器械。许多建议也将适用于使用HPV核酸（如HPV蛋白）以外的靶标的HPV检测器械。因此，本指南可能包含列表之外的未来HPV产品代码。本指南不适用于HPV相关生物标志物（例如，第16页）。

# IV. 健康风险

检测或检测和区分人乳头状瘤病毒的器械不能按预期发挥性能，或者不能正确解释结果，可能会导致宫颈癌筛查和治疗中不正确的患者管理决策。假阴性结果可能会导致宫颈癌的及时诊断和治疗延迟，使未被发现的疾病恶化，并有可能增加发病率和死亡率。假阳性结果可能会导致许多女性不必要地接受更频繁的筛查和潜在的侵入性操作，如阴道镜检查和活检。最高危型HPV（如HPV 16和/或18型）的假阳性结果可能会导致不必要的积极治疗宫颈病变，这可能会损害生育能力。由于建议对几乎所有性行为活跃的女性进行宫颈癌筛查，其中相当一部分女性将接受HPV检测，因此HPV假阴性和假阳性结果对公众健康的潜在危害的风险范围很大。因此，确定这些器械的性能并了解可能与使用这些器械相关的风险对于安全有效地使用这些器械至关重要。

为确定HPV检测器械的性能而在PMA中递交的研究是确定这些器械的安全性和有效性的关键因素。

# V. 器械描述

在您的PMA中，您需要提供器械描述以及其他信息（21 CFR 814.20（b）（3）（ii））。您应在PMA中提供器械描述，其中包含足以理解申报器械及其工作原理的信息，例如：

• 器械的文字描述以及图片、图表和/或工程图纸（如适用）。

• 作用机制和工作原理的解释。

• 器械输出的特性（例如，是否可以区分基因型，在加样孔或通道中同时或单独评估基因型等）。

• 器械的详细技术描述，包括仪器、试剂、部件、软件和附件。

• 器械的拟议适应症（包括样本类型和收集器械）。

# VI. 测试方法

您应详细描述您的器械在PMA中使用的方法。您应描述适用于您的器械的以下要素：

• 测试平台。

• 用于选择特定靶序列和用于设计检测元件的方法的信息和依据。

• 标本采集和处理方法。

• 用于标本收集、稳定和浓缩的所有分析前方法和仪器（视情况而定）。

• 测定的限制因素（例如饱和水平，最大循环次数等）。

• 提供或推荐使用的试剂组件及其在系统中的功能（例如，缓冲剂、酶、荧光染料、化学发光试剂、寡核苷酸、其他信号/扩增试剂等）。

• 试剂或器械材料可能产生的特定和非特定干扰效应。

• 内部对照及其在系统中的具体功能描述。

• 您建议或提供给使用者的外部对照。

• 使用器械所固有的工具，包括组件及其在系统中的功能。

• 从原始数据到报告结果的计算路径（例如，原始信号如何被处理并转换成可用的结果）。这将包括背景调整和归一化（如适用）。展示如何报告和解释结果。

• 插图、照片和非标准设备或方法的详细描述（视情况而定）。

# VII. 确定性能特征

## A. 分析研究

您应在PMA中提供符合以下建议的分析研究。

### (1) 检测限

FDA建议您使用样本收集缓冲液中的HPV基因组DNA或RNA转录本（视情况而定）的系列稀释来确定器械的检出限（LoD）。基因组DNA或RNA转录本，或两者都可以被克隆或合成材料，这是因为HPV无法培养。我们建议您确定器械检测的每个HPV基因型和每个标本采集培养基的LoD。

如果您的分析要求使用液基细胞学（LBC）样本进行检测，并且需要对宫颈细胞学样本样本进行离心，并在进行HPV检测之前去除LBC采集培养基（上清液），则您应在离心步骤后细胞重新悬浮的任何基质或缓冲液中进行LoD研究。如果您在任何分析研究中使用含有HPV感染细胞系的LBC模拟样本（根据下文第VII（a）（2）节精密度部分的建议），那么您也应对这些类型的样本进行LoD研究。建议用人HPV阴性细胞系作为由HPV感染细胞系（即SiHA和HeLa细胞系）制成的LBC样本中非HPV感染细胞的替代物。您应对其中至少一种HPV感染细胞系进行配对样本LoD研究，表明在合并的阴性临床和模拟背景基质（即，LBC培养基中的HPV阴性细胞系）中，您都得到了相同的LoD结果。如果这两种样本证明具有等同性，那么阴性细胞系可以用作其他分析研究的背景。

我们建议您首先定义数字信号的临界值（即空白限（LoB）），以便患者样本样本中高于LoB的信号表示检测到病毒。您还应估计95%的检出率（LoD）病毒水平。在建立临界值时，需要考虑两种不同类型的器械。一种类型涵盖当重复检测已知浓度为零（真正没有目标分析物）的样本时获得数字信号分布的器械。对于该器械类型，LoB是具有预定义I类错误（通常为5%）的数字信号的阈值，使得具有高于LoB的数字信号的样本被认为是“检测到HPV”。对于第二种类型的器械，即超灵敏器械，分析物浓度为零的样本几乎总是有“未检测到HPV”的结果（I类错误接近于零）。

我们建议您参考美国临床和实验室标准协会（CLSI）文件EP17-A2：“临床实验室测量程序检测能力的评价”[参考文献4]，以了解您的LoD研究的基本概念、设计和统计分析。对于上述第一种类型的器械，您可以使用CLSI EP17-A2：“临床实验室测量程序检测能力的评价”以及Linnet和Kondratovich的研究[参考文献5]中描述的方法，以用极低浓度样本的标准差估算LoD。对于第二种类型的器械，可以使用不同稀释度的检出率（检测到的病毒百分比）通过概率分析来估算LoD [参考文献6]。这些稀释度的检出率应覆盖很大一部分检测范围（0%到100%检出）。LoD应通过在LoD浓度下制备至少20份额外的重复样并证明95%的时间检测到病毒来确认。LoD研究应包括每种目标HPV基因型、细胞系或标本类型的系列稀释度。在这两种LoD估算方法中，通过使用2-3批器械在3-5天内检测3-5样本份样本，在LoD研究中包括适当的变量来源。

请注意，定义临床样本HPV检测阳性和阴性结果的临床临界值可能高于分析性定义HPV病毒存在与否的LoB。C95浓度是略高于临床临界值的分析物浓度，因此大约95%的时间该样本重复检测的结果是阳性。当LoB用作临界值时， C95浓度与LoD相同。对于临床临界值高于LoB的HPV检测， C95浓度可能与LoD浓度不同。

### (2) 精密度

#### a. 实验室内精密度/重复性研究的样本

为了建立HPV检测的精密度，您应创建10-20个具有定义的分析物水平和HPV基因型的精密度检测盘。除了中等分析物水平的样本（如下所述）外，还应使用分析物水平对医学决策点构成挑战的样本来建立性能。由于HPV不能培养，HPV感染人细胞系（以及人HPV阴性细胞系）可以用来创建模拟临床标本并含有目标水平的HPV分析物的检测盘。利用细胞系对LBC标本很重要，因为这有助于解释由于细胞异质悬液的取样和处理而产生的一些变异性。当您预期声明检测的HPV基因型无法作为感染细胞系轻易获取时，您也可以根据需要使用来自HPV DNA质粒或RNA转录本的人工检测盘。除了这些具有定义水平的HPV感染细胞或HPV核酸的人工样本外，您还应在精密度研究鉴定盘中加入四个或以上具有对检测临床临界值构成挑战的信号水平的真实临床样本，以及至少一个HPV阴性的临床样本。应使用真实临床样本，因为单独细胞系和质粒不能解决临床样本中存在的所有变异性。可以合并临床样本，以得到足够的样本量，并达到所需的病毒浓度水平。在某些情况下，合并临床标本可能会显著增加观察到的变异性；在这种情况下，您应与FDA联系，以讨论使用单个临床样本的替代研究设计。无法定义临床标本的病毒载量，但您应挑战医学决策点[即，临床临界值]，方式是只包括一小部分时间检测呈阳性和/或阴性的标本（该部分的确切值不是关键，5%到95%的阳性都可接受）。这样，终端用户可以看到哪些输出信号水平具有与其定性结果相关的变异性程度。来自细胞系和/或真实临床样本的检测盘应作为真实LBC标本进行处理，在核酸提取步骤之前，从LBC培养基中的悬液开始。如果您希望使用完全由真实临床标本（没有任何模拟标本）组成的精密度鉴定盘，请与FDA联系，以讨论有关此类标本的额外特征的建议。

我们建议您对包括复杂仪器或自动化组件的器械进行实验室内的精密度研究。您应包括变量来源（如操作员、天数、仪器、分析运行等），包括至少12天（不一定连续），每天运行两次，每次每样本份样本运行两份重复样。您应评估三个试剂批次之间的精密度；在每个试剂盒批次内评价的各个试剂批次，或者在单独销售的任何校准品或质控品中不应有任何冗余。仪器间不精密度可以在您的内部精密度研究期间进行评价，但更常见的是在申办者的再现性研究期间进行评估（如下文第VII（A）（2）（b）节“再现性”所述）。

对于模拟精密度检测盘，检测盘应至少包括下述三种病毒载量水平的六样本份样本（两个HPV基因型）（另见图表1）：

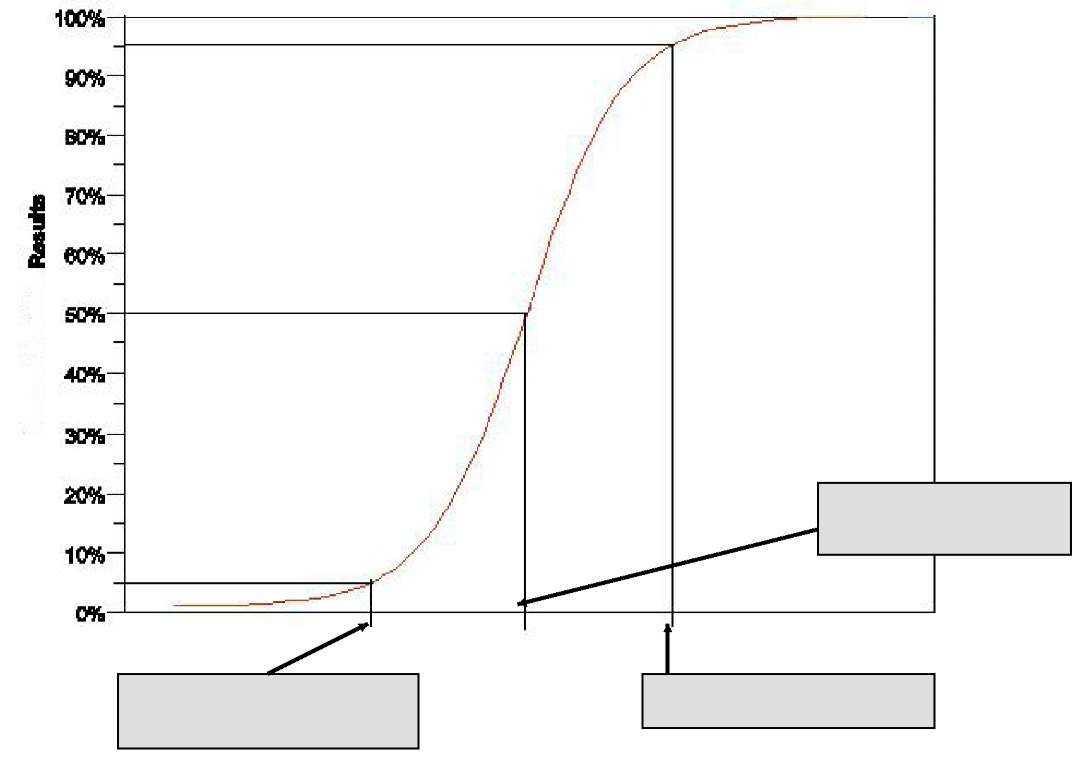
• **“零浓度”样本**，不含分析物。

• **“高浓度阴性”样本**，旨在表示低于临床设定的临界值的分析物浓度，从而使该样本的重复检测结果在*大约*95%的时间内为阴性，而在*大约*5%的时间内为阳性， C5 浓度（例如，对于实时PCR分析，分析物浓度低于临床分析临界值不超过10倍的样本）。

• **“低浓度阳性”样本（C95 浓度）**，其分析物浓度略高于临床临界值，因此大约95%的时间该样本重复检测的结果是阳性。

• **“中等浓度阳性”样本**，其浓度在大约100%的时间内可预期阳性结果（例如，约为临床临界值浓度的2至3倍）。

**图表1：精密度研究的三种水平**



**阳性结果百分比**

高浓度阴性C5

临床临界值

低浓度阳性C95

信号

当将LoB用作临床临界值时，则浓度C95 与LoD相同，零浓度（样本中不含分析物）为 C5 [参考文献4]。CLSI文件EP05-A3：“定量测量程序的精密度评价”[参考文献7]和EP12-A2：“定性测试性能评价的用户方案”[参考文献8]包含有关设计和执行精密度研究的更多信息。

对于精密度研究，没有必要确切在C5或C95下具有高浓度阴性和低浓度阳性样本。如果精密度研究中的高浓度阴性和低浓度阳性样本足够接近临界值，以至于标准差（或变异系数百分比（%CV））在临界值周围的范围内大致恒定，则可以根据此项实验室内的精密度研究评价 C5 和 C95。[[1]](#footnote-1)以这种方式估计C5和C95浓度的目的是确保您的精密度检测盘充分挑战您的医疗决策点。

**b. 再现性**

再现性研究的方案可能会因分析格式的不同而略有不同。我们建议使用以下方案：

• 评价在三个试验机构（例如，两个外部试验机构和一个内部试验机构）试验的再现性。

• 使用五天试验方案，包括每天至少运行两次（除非试验设计排除了每天多次运行）和每个检测盘每次运行三份重复样。

• 每天至少有两名操作员在每个机构进行试验。

• 再现性研究中的每个人工细胞系样本检测盘或临床样本检测盘应至少有90个测量值。

• 使用上述实验室内精密度研究中所述样本盘（包括基于再现性研究中的实验室内精密度研究估计的C5和C95样本）。为了进行再现性研究，细胞系检测盘和临床样本检测盘应从核酸提取步骤开始对每次运行进行处理，并对每次运行进行独立提取。

• 仪器间不精密度通常作为申办者再现性研究的一部分进行评估（而不是在内部精密度测试期间），方法是让每个场所使用不同的仪器进行测试。在这种设计下，仪器精密度与场所精密度混淆，如果观察到不同场所之间的精密度存在显著性差异，则申办者有责任进行另一项研究，以确定这种不精密度是由场所还是仪器造成的。

**c. 精密度研究结果的呈现方式**

对于在精密度研究（实验室内部精密度研究和再现性研究）中测试的每样本份样本，我们建议您报告信号均值及其方差分量（标准差和百分比CV）。此外，在精密度研究中您还应包括每样本份样本高于和低于临界值的百分比。对于再现性研究，分别给出每个场所和组合数据的均值和其方差分量以及高于和低于临界值的值的百分比。

我们建议您查阅CLSI文件EP05-A3：“定量测量程序的精密度评价”[参考文献7]和EP15-A3：“精密度的用户验证和偏倚的估计”[参考文献9]，以了解有关再现性研究设计和统计分析的更多信息。

### (3) 交叉反应

我们建议您检测您的器械与其他已知定植在生殖道中的微生物（包括通过性接触传播的人类病原体）的潜在交叉反应。我们建议您检测医学相关性病毒和细菌水平（病毒通常为105 pfu/mL或更高，细菌通常为106 cfu/mL或更高）。我们建议您确认病毒和细菌的分类和滴度。尤其是滴度，通常由供应商估计，但不能保证。下表1所示为推荐用于交叉反应研究的微生物。根据患病率、临床相关性或两者兼而有之，推荐特定种属，但也可以由申办者自行决定检测其他种属。应已知，选择的任何其他种属都会定植在生殖道上。如果有理由怀疑可能会发生交叉反应（即交叉反应的临床证据、与所选探针/引物序列的同源性等），则应对其他微生物进行检测。

对于靶向一组HPV基因型但未在其中加以区分的器械，您应检测最密切相关和/或最具临床意义的非靶HPV基因型的交叉反应。对于检测到一种以上HPV基因型并在其中进一步加以区分的器械，您应检测目标基因型之间的交叉反应。由于HPV不容易培养，根据目标分析物的不同，HPV基因型可以在质粒或体外转录本中以克隆基因组HPV DNA的形式进行检测。

**表1：推荐用于分析特异性（交叉反应）研究的微生物。**

|  |  |
| --- | --- |
| **微生物** | |
| **细菌：** | **人乳头状瘤病毒：** |
| *嗜酸乳杆菌* | 所有非靶向α-HPV基因型。α-HPV基因型包括以下内容：HPV 16、18、26、30、31、33、34、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、67、68、69、70、73、82、85 |
| 表皮葡萄球菌 |
| *金黄色葡萄球菌* |
| *粪链球菌* | HPV 6、11 |
| *酿脓链球菌* | 根据探头同源性分析（例如BLAST检索结果），任何可能与您的检测交叉反应的非靶向生殖器HPV基因型。 |
| *无乳链球菌* |
| *棒状杆菌属* |
| *砂眼披衣菌* |  |
| *淋病奈瑟菌* | **其他病毒：** |
| 大肠埃希菌 | 腺病毒 |
| *肠球菌属* | 巨细胞病毒 |
| *梭菌属* | 爱泼斯坦-巴尔病毒 |
| *消化链球菌属* | 1型单纯疱疹病毒 |
| *肺炎克雷伯菌属* | 2型单纯疱疹病毒 |
| 肠杆菌属 |  |
| *变形杆菌属* |  |
| *假单胞菌属* |  |
| *拟杆菌属* | **其他：** |
| *双歧杆菌属* | 白色念珠菌 |
| *梭杆菌属* | *阴道毛滴虫* |
| *梅毒螺旋体* |  |

### (4) 干扰

我们建议您使用医学相关性浓度的干扰物和至少一种最具临床相关性的HPV基因型（如HPV 16或HPV 18）进行全面干扰研究，以评估宫颈标本中出现的物质的潜在抑制作用。

潜在干扰物质包括但不限于：全血（人）、白细胞、避孕用具和女性卫生用品。应在您的标签中提供所选产品的有效成分和商标名称以及检测浓度。下表2所示为潜在干扰物质的示例。我们建议您使用所含分析物水平对临床临界值周围的医学决策点构成挑战的样本进行干扰测试（例如，C95）。我们还建议您以潜在的最高浓度（即“最差情况”）来评价每种干扰物质。完成以上评价的一种方式是将标本收集器械直接浸入潜在干扰物质中，然后将收集器械放入一等分的分割测试标本中。将在没有潜在干扰物的情况下测试另一等分，以便可以比较配对样本之间的信号。在这种方法中，两种等分试样（含有和没有潜在干扰物）都以与患者标本相同的方式进行测试，患者标本在一次分析运行中有足够的重复样（至少四到七份重复样）。计算作为两种等分试样的均值之差的观察干扰效应的估计值，并计算干扰效应的95%双侧置信区间。如果没有观察到显著临床效果，则不需要进一步的测试。我们建议您参考CLSI文件EP07-A2：“临床化学中的干扰测试；获批指导原则”[参考文献10]，以了解有关干扰测试的其他信息。

**表2：推荐用于干扰研究的物质。**

|  |
| --- |
| **物质** |
| 全血（人） |
| 白细胞（1x106个细胞/mL） |
| 避孕胶冻 |
| 灌洗器 |
| 抗真菌霜 |
| 杀精子剂 |
| 阴道润滑剂 |
| 女性喷雾 |
| 阴道内激素 |
| 粘液 |

### (5) 携带污染和交叉污染研究（适用于带有自动液体处理系统的器械）

我们建议您证明根据建议的使用说明您的器械不会发生携带污染和交叉污染。在携带污染和交叉污染研究中，我们建议根据器械的操作功能，按模式连续交替使用高阳性样本和阴性样本。应进行至少5次交替使用高阳性样本和阴性样本的运行。我们建议，研究中的高阳性样本应足以超过目标使用人群中疾病患者标本所获得结果的95%或更多。然后，可以通过携带污染研究中与高阳性样本相邻的阴性样本的阴性结果百分比与在没有相邻高阳性样本的情况下的阴性结果百分比相比（即，只有阴性样本在培养板上运行）来估计携带污染和交叉污染效应。有关更多详细信息，请参见Haeckel[参考文献11]。对于适用于残留细胞学样本的HPV检测的器械，应提供任何上游自动细胞学处理系统的携带污染效应分析。

### (6) 标本储存和运输条件

对于您推荐的标本储存条件，您应证明您的器械在整个推荐储存期间的多个时间点为储存的标本生成与零时间点相同的结果。评价的储存温度应代表您推荐的温度范围的每个极端。您应利用一组真实临床标本来建立您的标本储存和运输条件，这些标本代表您的适应症中宣称的标本类型和挑战您分析的医学决策点的分析物水平。应在测试的每个时间点给出每个检测盘的信号变更百分比（与零时间点比较时），以及给出所有组合检测盘的变更百分比。使用回归分析时，应分别对每样本份样本进行分析，以便以95%的置信区间计算建议储存时间与零时间点（T0）之间的信号绝对差值和百分比差值。应对所有组合样本盘进行类似的回归分析。对于这些研究，应记录有关所用样本的详细信息，并将其包括在您的递交资料中。

您应记录日期[包括日期和时间]从患者身上收集标本以及测试样本的日期。您对这些日期的记录应至少包括这两项活动的日期和时间，我们建议您为临床研究中测试的所有标本以及为建立稳定性研究的T0而测试的标本递交此信息（在那些用于建立稳定性的样本中）。此外，如果担心标本类型的稳定性，可能需要使用人工样本进行额外的研究，以更仔细地建立T0。

### (7) 试剂储存和运输条件

对于您推荐的试剂储存条件，您应证明您的器械在整个推荐储存期间的多个时间点使用储存的试剂生成与零时间点相同的结果。评价的储存温度应代表您推荐的温度范围的每个极端。我们建议您参考CLSI文件EP25-A：“体外诊断试剂稳定性的评价”[参考文献12]，以了解额外信息。加速稳定性研究适用于评估试剂稳定性，但您递交资料的数据应显示实时性能。您应利用您的预期用途中宣称的样本类型和挑战您分析的医学决策点的分析物水平建立您的试剂储存和运输条件。应在测试的每个时间点给出每个检测盘的信号变更百分比（与零时间点比较时），以及给出所有组合样本盘的变更百分比。使用回归分析时，应分别对每样本份样本进行分析，以便以95%的置信区间计算试剂储存时间与T0之间的信号绝对差值和百分比差值。应对所有组合鉴定盘进行类似的回归分析。

### (8) 临床数据集中HPV检测的评价

我们建议您评价您的器械在临床数据集中检测目标HPV基因型的能力。完成以上评价的一种方式是使用FDA批准的HPV检测，其中检测到与您的测试相同的基因型，或者您可以对临床标本执行PCR，然后对扩增子进行测序（PCR/测序），并将这些结果与您的器械的结果进行比较。建议在可行的情况下使用FDA批准的HPV检测。使用包含多项FDA批准的HPV检测和/或PCR/测序的复合型HPV比较产品也是一种选择。复合参比方法中使用的核酸扩增方法应靶向不同于您的分析方法所探测的基因组区域。您应在递交资料中提供发表的文献或实验室数据，以支持用于扩增的引物。

对于PCR和Sanger先后测序，我们建议您对扩增子的两条链进行测序反应（双向测序），生成的序列应满足以下所有验收标准：

• 序列包含至少100个连续碱基，

• 根据PHRED、Applied Biosystems KB Basecaller或类似软件包的测量，碱基的质量值为20或更高（这表示错误概率为1%或更低），以及

• 序列与参比序列或共有序列匹配，例如GenBank中BLAST检索的特定靶标的期望值（E值）<10-30（http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/）。

随着新一代测序（NGS）（也被称为高通量测序（HTS））技术的发展和成熟，其也可能用于复合参比方法。基于这些技术的比较方法应经过确认，并且应满足预先指定的质量指标。有关在临床数据评价中使用NGS/HTS方法的更多信息，请联系FDA微生物器械分部。

与FDA批准的HPV基因分型测试或PCR/测序进行比较，对于HPV基因分型分析尤其重要，以确定您的器械已识别出正确的HPV基因型。

请注意，当设置的临床临界值高于LoB时，HPV检测发现样本呈阴性的情况有两种：1）HPV检测检出一定量的分析物（分析物水平高于LoB），但是这个量低于用于定义阳性和阴性结果的临床临界值（下表3中的“检测到”=“LoB<信号<临床临界值”）或2）HPV检测没有检出感兴趣分析物（下表3中的“未检测到”=信号≤LoB）。为了将HPV检测与上文讨论的适当比较测试法进行比较，请描述在上文定义的HPV检测阴性的样本中是否检测到分析物。您应在表格中分别列出意义不明确的非典型鳞状细胞（ASC-US）和上皮内病变或恶性肿瘤阴性（NILM）≥30人群的比较结果。对于仅针对25岁及以上女性人群进行的初步筛查指征的测试，请分别提供NILM和≥ASC-US的数据，以及包括NILM、≥ASC-US和UNSAT的全队列人群的数据（细胞学结果不令人满意）。下表3所示为一个数据显示格式的示例。

**表3：临床数据集中HPV检测的数据显示格式示例。**

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | | 对比方法的结果 | | | 总计 |
| 高危阳性 | 高危阴性 | 不确定 |  |
| HPV阳性 | |  |  |  |  |
| HPV  阴性 | 检测到 |  |  |  |  |
| 未检出 |  |  |  |  |
| 其他（无效） | |  |  |  |  |
| 总计 | |  |  |  |  |

HPV检测的评价应分别针对每个试验机构和每种类型的采集培养基进行。为了区分HPV基因分型测试，您应在表格中分别列出针对ASC-US和NILM≥30人群比较所有HPV测试输出和比较测试法相同输出的数据。有关详细信息，请参见CLSI MM17-A第9部分：“多重核酸检测的验证和确认”[参考文献16]。

HPV基因分型测试的数据显示格式示例，有五种可能的结果：下表4提供了HPV16阳性、HPV18阳性、HPV16和HPV18阳性、阴性和无效（不确定）：

**表4：HPV基因分型测试的数据显示格式示例。**

|  |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 对比方法的结果 | | | | | | | | |
|  | 无高危型 | 一种高危型 | | | 两种高危型 | | | | 多种高危型 |
|  |  | 16 | 18 | 其他 | 16和18 | 16和其他 | 18和其他 | 其他 |  |
| 阳性：HPV16 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 阳性：HPV18 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 阳性：HPV16和18 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 阴性 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 其他无效/不确定 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |
| 总计 |  |  |  |  |  |  |  |  |  |

## B. 临床性能研究

您应在PMA中提供符合以下建议的临床性能研究。

### (1) 宫颈癌筛查指导原则的考虑事项

专业的宫颈癌筛查指导原则有助于定义HPV器械在更大的患者管理计划中所发挥的作用，因此可用于评估HPV器械及其支持数据的任何预期用途声明。本指南中将考虑的指导原则是《子宫颈癌筛查异常妇女处理的共识指南（2006版）》（2006共识指南）[参考文献13]，以及2012年对这些指南的更新（2012共识指南）[参考文献23和24]，这些指南是迄今为止关于宫颈癌筛查的最新共识指南。

应考虑最新版本的指导原则，因为建议可能会发生变更。

尽管FDA的评价考虑了专业指导原则，但HPV检测的预期用途主要由送去进行测试批准的数据支持，通常仅限于评价的人群和样本类型。研究的重点是在根据HPV检测结局分层的特定人群中确定女性患宫颈疾病的风险。可以更概括性地编写HPV检测的预期用途（例如以下“辅助”预期用途），以允许临床医生在他们认为合适的时候灵活地利用这些风险信息，特别是在制定未来的宫颈癌筛查指导原则时。

### (2) 预期用途

您的器械的拟议预期用途应促进您的临床研究设计以评估性能，因为您的预期用途最终将决定FDA将如何审评您的数据。以下是可能适用于HPV检测器械的预期用途声明示例：

[商品名]HPV检测是一种[分析技术或类型]分析方法，用于定性检测宫颈癌标本中的高危型人乳头状瘤病毒（HPV）[注明靶标，例如DNA、RNA转录本或蛋白质]。通过分析检测到的HPV类型是高危型HPV[列出类型-注明测试是否可以识别出特定类型]。 可用[商品名]HPV检测进行测试的宫颈标本包括[插入可通过分析检测的样本类型和可用于收集样本的收集器械类型]。

本检测的用途如下：

1. 对21岁及以上意义不明确的非典型鳞状细胞（ASC-US）宫颈细胞学结果进行筛查，以确定是否需要转诊至阴道镜检查。

2. 在30岁及以上的女性中，[商品名]检测可与宫颈细胞学联合用于辅助筛查，以评估是否存在高危型HPV。本信息，连同医生对细胞学史、其他风险因素和专业指导原则的评估，可以用来指导患者治疗。

以下是可能适用于HPV检测和区分器械的预期用途声明示例：

3. 在25岁及以上的女性中，[商品名]检测可以作为检测高危型HPV的一线初步宫颈癌筛查测试，包括16和18的基因分型。通过[商品名]检测的高危型HPV检测为阴性的女性应根据医生对筛查和病史、其他风险因素和专业指导原则的评估进行随访。通过[商品名]检测的HPV基因型16和/或18检测为阳性的女性应转诊至阴道镜检查。通过[商品名]检测的高危型HPV检测为阳性，而HPV16/18检测为阴性的女性应接受宫颈细胞学评价，以确定是否需要转诊至阴道镜检查。

**在本指南中，第一个预期用途将称为“ASC-US分流”预期用途，第二个预期用途将称为“辅助”预期用途，第三个预期用途将称为“初步筛查”预期用途。**根据更普遍的研究设计建议，具体预期用途的研究设计考虑事项如下所述。

### (3) ASC-US分流、辅助和初步筛查预期用途（以及可能的任何其他预期用途）共同的研究设计考虑事项：

有关一般研究设计指南，请参见FDA指南，标题为“医疗器械关键临床研究的设计考虑事项”

（http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM373766.pdf） 以及FDA指南，标题为“评价诊断性检测的研究报告结果的统计指南”

(http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm0 71148.htm).

**a. 美国境外研究场所的使用（21 CFR 814.15）**

如果您使用在美国境外进行的一项研究中收集的临床数据来支持您的PMA，而且并非按照临床试验用器械豁免（IDE）执行，您必须确保数据具有科学有效性，并根据21 CFR 814.15保护人类受试者的权利、安全和福利。若要作为上市批准的唯一依据，您的数据必须适用于目标使用人群和美国医疗实践（21 CFR 814.15（d）（1））。在美国境外进行的研究的关注方面包括特定高危型HPV的患病率、患者筛查间隔、筛查开始和性行为的平均年龄、宫颈癌风险、宫颈取样方法、医疗或临床实践的差异以及种族。如果您打算根据国外数据寻求批准，我们鼓励您通过预递交/流程联系FDA，从而降低国外研究不支持您的预期用途的风险。

有关预递交流程的额外信息，请参见FDA指南，标题为“医疗器械递交的反馈申请：美国食品药品监督管理局工作人员举行的上市前申报计划和会议”。

（http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM311176.pdf） ，然后开始研究。

**b. 组织学审查**

FDA将阴道镜检查和活检（如有必要）结果视为临床研究受试者疾病评估的临床参考标准（即金标准）。您可以选择使用在每个临床场所生成的组织学结果，但我们建议使用一个集中化三位病理学家审评（CPR）专家小组，该专家小组可能会为您的研究生成更一致且更准确的疾病评估。这三位病理学家应区分宫颈上皮内瘤样病变（CIN）2和3，不应将这两个类别合并用于报告目的（即，不应报告“CIN2/3”的结果）。如果您选择使用利用新版2级《肛门下生殖道鳞状细胞病变命名（LAST）》建议的集中化专家小组和/或临床场所[参考文献25]，以报告宫颈组织学结果（如低级别鳞状上皮内病变（LSIL）和高级别鳞状上皮内病变（HSIL），使得生物标志物p16的免疫组织化学染色用于将任何考虑的中间类别（CIN2）阐明为LSIL或HSIL，则基于苏木精和伊红（H&E）染色切片审查的3级结果（即CIN1、CIN2或CIN3）应与2级诊断（基于每位患者的H&E和p16染色切片的审查）一起标示。您还应向FDA提供在您的研究中用于宫颈组织学的任何非FDA批准的p16检测的分析确认数据。请在开始使用LAST建议的研究或任何其他使用p16生物标志物的组织学报告之前通知FDA。

我们建议CPR专家小组为受试者建立临床参考标准（即临床事实），并建议三位专家病理学家中的两位以设盲方式独立审查切片。如果两位病理学家达成一致意见，则诊断应被视为临床参考标准。如果两位病理学家没有达成一致意见，第三位专家病理学家应以设盲方式独立查看切片。如果三位专家病理学家的诊断中有任何一位达成一致意见，则这应被视为受试者的临床参考标准。如果在第三位病理学家审查后没有达成一致意见，所有三位专家病理学家应在多头显微镜（或同等技术）下一起审查切片，尝试达成共识诊断（如果不能达成完全共识，则以3人中的2人为多数决定原则）。在递交数据时，您应提供有关不一致的组织学结果是如何解决的信息。如果您的CPR专家小组和/或临床场所正在使用新的2级LAST建议，则3位病理学家中的2位应在p16染色（即，CIN1、CIN2、CIN3）之前，使用与不使用p16时相同的方法，在病理学家中达成初步组织病理学诊断的共识，以确定临床事实，如上所述。应在进行p16染色后达成最终共识。

**c. 细胞学报告术语**

收集场所应使用细胞学报告术语，这些术语可转换成2014 Bethesda宫颈细胞学报告系统（2014 Bethesda系统），或更新的Bethesda系统（如果可用）[参考文献14]。在向FDA报告结果之前，细胞学结果应转换为2014（或更新的）Bethesda系统。

**d. 设盲**

研究者、患者和临床医生（包括那些进行阴道镜检查和组织学检查的人员）在阴道镜检查/组织学检查完成之前应就患者的HPV状态设盲，以避免研究中产生偏倚。建议就HPV初步筛查研究额外设盲，如下文第VII（B）（8）部分的初步筛查预期用途中所述。

此外，该方案还应明确规定哪些检测结果最终将发布给医生和患者，以及在什么情况下细胞学和HPV结果将揭盲，因为这可能会无意中对后续研究产生偏倚。

**e. 人乳头状瘤病毒基因型**

对于检测高危型人乳头状瘤病毒的分析，应包括以下由世界卫生组织国际癌症研究机构（IARC）归类为“具有致癌性的”基因型：16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58和59[参考文献15]。如果您的试剂没有包括任何这些推荐的HPV基因型，您应解释原因。其他基因型，例如那些由IARC认定为“很可能具有致癌性的”或“可能具有致癌性的”基因型（即66、68型）也可能被包括在内。我们建议您在开始研究之前与FDA讨论纳入任何其他人乳头状瘤病毒基因型的受益和风险。

**f. 标本采集培养基**

我们建议您针对您预期用途中宣称的每种类型的标本采集培养基（即特定品牌的液基细胞学采集液）进行所述的分析和临床研究。应分开介绍每种采集培养基的临床性能。

**g. 标本收集器械**

可用于收集标本以供您的器械进行检测的收集器械列表应在您的预期用途声明中加以描述，并应批准与您指定的细胞学方法联合使用。不需要在您的分析研究中评价每个宣称的收集器械（例如，病毒刷/刮刀 vs. 宫颈帚）。然而，每个指定的收集器械都应在您的临床研究中进行评价。应分开介绍每种收集器械的临床性能。

**h. 标本收集-总则**

对于在您的临床研究中收集的每个标本，您应记录从患者收集标本的日期、运送到检测实验室并由检测实验室接收的日期，以及检测样本的日期。

**i. 活检方法**

每项研究中所有患者和所有场所使用的活检方法应一致。如果针对不同的适应症进行单独的研究（例如，ASC-US分流 vs. 辅助），那么每项研究可能使用不同的活检方法。如果给定适应症的数据集中的活检方法不一致，可能会导致您的研究出现偏倚，从而妨碍您正确确定该适应症的性能特征。标准化活检方法可以有相关的变量，但这些变量应与阴道镜检查期间可视化后的宫颈外观相关，例如有无可见的病变，或鳞柱状上皮交界处（SCJ）的可见度。如果需要额外的变量，您应在开始研究之前与FDA讨论。请注意，病变区域和非病变区域的活检应在您的病例报告表上区别注明。

**j. 细胞学样本等分**

从细胞学样本中寻求HPV检测的预期用途的申办者在设计他们的研究时，应考虑他们是应从预等分的细胞学样本（在切片处理前取等分试样）还是从剩余的细胞学样本（切片处理后取等分试样）进行检测。只有当细胞学收集系统在细胞学切片处理之前已被批准去除等分试样时，才能进行细胞学样本的预等分。这将确保患者的细胞学测试结果不会因为对其细胞学标本的不当处理而受到损害。

或者，寻求从残留的细胞学标本中进行研究的申办者应分析评估细胞学切片处理过程中的携带污染效应（见第VII（A）（5）部分携带污染和交叉污染研究（对于带有自动液体处理系统的器械））。担心污染的扩增分析申办者可能需要使用替代标本采集系统或获得批准进行预等分的系统，以解决其污染问题。申办者如果对预等分细胞学标本进行临床研究，随后寻求检测残留细胞学标本，则除了进行上述分析携带污染和交叉污染研究外，还应比较一组配对预等分细胞学标本和残留的真实临床细胞学标本的结果。

**k. HPV基因分型分析结果报告**

结果应以临床医生容易判断的方式报告。适当情况下，具有相似风险等级的HPV基因型组应分组报告，而不是单独报告。

在PMA中，您应描述如何确定每个报告的结果或无效的结果，以及如何对其进行解释。您应标明所有分析输出的临界值。

如果分析结果无效，您应描述如何定义无效结果。如果内部对照是确定无效结果的一部分，则应提供定义无效结果的每种可能的对照结果组合的解释。您应提供有关如何跟进任何无效结果的建议（即，是否应将结果报告为无效或是否建议重新测试）。

**l. HPV疫苗接种和研究人群**

在估计样本量时，您应考虑到，随着接种HPV疫苗的人数增加，这将导致美国宫颈疾病总体患病率的下降。在估计研究样本量时，应考虑目前对疫苗接种率和疾病患病率的估计。随着美国各地接种疫苗的人数增加，纳入未接种疫苗人数高于平均水平的研究场所可能最终会变得可取。请注意，在这种情况下，还应评价接种人数平均水平的研究场所。考虑这类设计的申办者应在开始研究之前与FDA讨论这一选择。

### (4) ASC-US分流预期用途

您应使用代表目标使用人群的样本（即具有ASC-US宫颈细胞学结果的患者）进行前瞻性临床研究，以确定您的器械对于您在标签中宣称的所有样本类型和样本收集器械的临床性能。本项研究应代表整个目标使用人群，包括年龄。定性测试（测试有两种结果，阳性或阴性）的临床性能由其临床灵敏度和特异性、阳性和阴性预测值以及患病率来描述。您器械的临床灵敏度指您的检测呈阳性的癌前病变或癌症[大于或等于宫颈上皮内瘤样病变2（≥CIN2）[[2]](#footnote-2)]的个体比例。您器械的临床特异性指您的检测呈阴性的没有癌前病变或癌症（<CIN2）的个体比比例。这些性能特征应在至少三个代表美国临床场所的研究场所进行的前瞻性临床研究中确定。对于有两个以上结果的测试，临床性能用似然比、每个结果中受试者的百分比和患病率来描述。

**a. 标本采集和处理**

正确的标本采集和处理对于确定HPV检测的性能特征至关重要。对于ASC-US分流预期用途，研究的女性人群应从妇产科诊所招募。请注意，阴道镜检查诊所不是ASC-US分流评价的良好患者来源，因为在阴道镜检查诊所就诊的女性已经被确定需要阴道镜检查（即，已经通过其他测试确定HPV呈阳性，或者通过细胞学重复ASC-US）。由于已知需要阴道镜检查的女性不是ASC-US分流预期用途的目标人群，因此不应将这些人群用于您的研究，因为得出的性能估计将不准确。在阴道镜检查诊所就诊的女性人群中，HPV感染和宫颈疾病的患病率都较高，由于验证偏倚，器械灵敏度可能会被夸大。

对于直接从液基细胞学（LBC）样本进行的检测，所有试验用HPV检测结果应在用于产生细胞学结果的同一LBC样本上进行。这将使您能够避免研究中的任何取样偏倚（即，在采集原始细胞学样本和试验用样本之间可能会解决的感染，第一样本份样本中HPV感染细胞的很大一部分被移除等）。虽然在采集额外样本时缓解取样偏倚的一种方法是将对两样本份样本执行的测试程序（即细胞学和HPV检测）随机化，但这不是在患者中产生细胞学结果的可接受方法。从患者身上提取的第一个细胞学样本应始终是用于产生细胞学结果的样本，以便该结果（以及随后患者的健康）不会受到损害。因此，对两个细胞学样本进行随机检测并不能缓解HPV研究的取样偏倚。

从妇产科诊所而不是阴道镜检查诊所入组患者的一个挑战是处理大量不属于目标使用人群的女性。如果您正在进行一项大型研究，以支持多种HPV检测预期用途，那么入组所有女性（而不考虑细胞学状况）参加您的研究可能是明智的。另一种选择是，如果ASC-US分流预期用途是在一项单独的研究中进行，则只将ASC-US宫颈细胞学结果的患者纳入您的前瞻性临床研究。当使用后一种方法时，重要的是建立用于获得最初用于生成登记ASC-US结果的原始细胞学样本的程序，以避免如上所述的取样偏倚。

**b. 临床参考（“金”）标准**

您的研究应设计为，所有妇产科诊所的ASC-US细胞学检查的女性都将继续接受阴道镜检查（无论HPV状态或其他因素如何）。研究者、患者和临床医生（包括那些进行阴道镜检查和组织学检查的人员）在阴道镜检查/组织学检查完成之前应就患者的HPV状态设盲，以避免研究中的偏倚。

收集筛查宫颈细胞学标本和随后的阴道镜检查之间的时间不应超过12周。在这些过程之间允许过长的时间可能会导致HPV感染及其相关宫颈病变的自发消退率高于正常水平，这将对您对临床灵敏度和特异性的评估产生不利影响。

您应描述临床研究中使用的阴道镜检查程序详细信息，阴道镜检查程序结果应归类为（阴道镜检查阴性/无活检）、活检阴性、CIN 1、CIN 2、CIN 3、原位腺癌和癌症。此外，如果您使用的是2级LAST系统，您应将阴道镜检查程序结果显示为（阴道镜检查阴性/无活检）、活检阴性、LSIL、HSIL和癌症。

**c. HPV检测的临床性能评价**

HPV检测测试（一种定性测试）的临床性能由其临床灵敏度和特异性、阳性和阴性预测值以及目标条件在目标使用人群中的患病率来描述。

下表5所示为具有二元结果（阳性和阴性）的定性测试的可接受数据显示格式的示例：

**表5.-HPV定性检测结果表**

|  |  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 阴道镜检查阴性 | 中心组织学 | | | | |  |
|  |  | 阴性 | CIN1 | CIN2 | CIN3 | 癌症 |  |
| HPV阳性 | A1 | A2 | A3 | A4 | A5 | A6 | A1+A2+A3+A4+A5+A6 |
| HPV  阴性 | B1 | B2 | B3 | B4 | B5 | B6 | B1+B2+B3+B4+B5+B6 |
| 总计 | A1+B1 | A2+B2 | A3+B3 | A4+B4 | A5+B5 | A6+B6 | N |

我们建议，除了上表5中的信息外，您还应提供有关CIN2及以上（≥CIN2）疾病且试验用HPV器械的HPV阴性结果的额外信息。请加上脚注，描述对B4、B5和B6有影响的每个受试者的对比方法结果（即，序列阳性/阴性），

您的器械在目标条件“CIN2及以上”（≥CIN2）下的临床性能应评价如下：

灵敏度 = （A4+A5+A6）/（A4+A5+A6+B4+B5+B6）；

特异性 = （B1+B2+B3）/（A1+A2+A3+B1+B2+B3）

阴性预测值（PPV）=（A4+A5+A6）/（A1+A2+A3+A4+A5+A6）

阴性预测值（NPV）=（B1+B2+B3）/（B1+B2+B3+B4+B5+B6）

≥CIN2的患病率=（A4+A5+A6+B4+B5+B6）/N

由于CIN3病变比CIN2病变更可能进展为宫颈癌[参考文献 17]，因此还应提供您的器械在目标条件“CIN3及以上”（≥CIN3）下的临床性能：

灵敏度 = （A5+A6）/（A5+A6+B5+B6）；

特异性 = （B1+B2+B3+B4）/（A1+A2+A3+A4+B1+B2+B3+B4）

PPV=（A5+A6）/（A1+A2+A3+A4+A5+A6）

NPV=（B1+B2+B3+B4）/（B1+B2+B3+B4+B5+B6）

≥CIN3的患病率=（A5+A6+B5+B6）/N

灵敏度和特异性以及阳性和阴性预测值的估计应与95%的双侧置信区间一起提供。对于灵敏度和特异性的95%置信区间，推荐使用计分方法(score method)。有关分数置信区间的更多详细信息，请参见第IX部分附录-统计分析和CLSI EP12-A2：“定性测试性能评价的用户方案；获批指导原则”[参考文献8]。预测值的置信区间可以根据相应的似然比的置信区间（似然比的估计值是两个独立比例的比率；因此，可以使用两个独立比例的比率的置信区间；见第IX附录附录-统计分析）来计算（当患病率不变时）。

目标条件≥CIN2的临床性能应按年龄分层。应根据筛查指导原则提供以下每个年龄组的≥CIN2患病率、灵敏度、特异性、PPV值和NPV值以及95% CI：21-30（进一步分层：21-24和25-29）、30-39和>39。

**d. 样本量**

当考虑用于ASC-US分流预期用途的样本量时，应考虑ASC-US患者建立临床灵敏度和特异性的点估计值所需的样本数量，以及95%双侧置信区间的下限。宫颈疾病的临床灵敏度（≥CIN2和≥CIN3）是HPV检测的最关键的性能参数，因为假阴性HPV检测结果可能会导致宫颈癌的检测和治疗的延误[参考文献13]。

如果您的器械估计的临床灵敏度、特异性以及随后的阳性和阴性预测值不符合当前对HPV检测的性能预期[参考文献23和24]，可能需要对您的性能数据进行专家小组审评，以评估您的测试的临床有效性。

**e. HPV检测的适当临床临界值的选择**

根据对临床样本初步研究的受试者工作曲线（ROC）分析获得的相关的灵敏度和特异性水平，可支持选择合适的临床临界值。HPV检测在选定的临床临界值的临床性能可以通过一项关键的临床研究进行理想地评估。在某些情况下，可以在关键的临床研究中使用无偏倚的程序和适当的样本量来确定临床临界值。如果临床可接受的灵敏度水平是预先指定的（例如，93%-95%的灵敏度水平在目标使用人群中是临床可接受的），则关键研究可以用来建立与预先指定的灵敏度水平相对应的临床临界值，并获得具有该选定临界值的HPV检测的临床性能的无偏倚估计[参考文献18和参考文献19]。

### (5) ASC-US人群-用于检测和区分的HPV测试（HPV基因分型测试）

以上第VII（B）（4）部分ASC-US分流预期用途中所述的研究原则旨在为细胞学检查为ASC-US的≥CIN2女性确定临床灵敏度和特异性，这些研究原则既适用于二元结果的HPV检测（HPV为阳性或阴性），也适用于多重结果的HPV基因分型测试。

检测和区分HPV基因型的测试通常有多重结果（如HPV16+、HPV18+、HPV16/18+等）。检测和区分HPV基因型的测试的临床性能由每个测试结果的目标条件的概率，以及每个测试结果的研究受试者的百分比以及每个结果的疾病患病率来描述。

除了在ASC-US人群中建立≥CIN2的HPV基因分型测试的临床灵敏度和特异性外，还应建立每个检测结果的似然比和每个检测结果的研究受试者的百分比，如下所述。下表6所示为在ASC-US人群中进行HPV基因分型临床研究的可接受数据显示格式的示例（显示的示例具有以下结果：HPV16+、HPV18+HPV16/18+等）：

**表6.-HPV基因分型测试结果的数据显示**

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
|  | 阴道镜检查阴性 | 中心组织学 | | | |  |
|  | 阴性 | CIN1 | CIN2 | ≥CIN3 |  |
| 阳性：HPV16 | A11 | A12 | A13 | A14 | A15 | A11+A12+A13+A14+A15 |
| 阳性：HPV18 | A21 | A22 | A23 | A24 | A25 | A21+A22+A23+A24+A25 |
| 阳性：HPV16和18 | A31 | A32 | A33 | A34 | A35 | A31+A32+A33+A34+A35 |
| …… | …… | …… | …… | ….. | ….. | …… |
| 总计 |  |  |  |  |  | N |

针对目标条件≥CIN2的这种测试的临床性能评价方式如下：每个测试结果的似然比X每个测试结果的研究受试者的百分比。测试结果的似然比（LR）X，LR（T=X）汇总了患有疾病（≥CIN2）的受试者具有该特定结果X，Pr（T=X|D+）的可能性是无疾病受试者Pr（T=X|D-）的多少倍：LR（T=X）= Pr（T=X|D+）/Pr（T=X|D-）。

以下计算还应在您的PMA中描述，以进行HPV基因分型测试：

• K个结果（K是多个不同结果）各项的似然比应与95%置信区间一起计算。

• 除了似然比，患者对K个结果中的各项都有≥CIN2的患者概率应与95%的置信区间一起计算。作为说明性示例，HPV16阳性结果的概率评价如下：概率（≥CIN2|HPV16阳性）=（A14+A15）/（A11+A12+A13+A14+A15）。

• 还应提供临床数据集中K个结果所占百分比。例如，对于HPV16阳性结果：概率（HPV16阳性）=（A11+A12+A13+A14+A15）/N（式中，N是带有检测结果的女性总数）。

• 此外，组合结果HPV16/18+（HPV16/18+定义为HPV16阳性或HPV18阳性或两者均阳性）的≥CIN2概率应计算如下：概率（≥CIN2| HPV16/18+）=（A14+A15+A24+A25+A34+A35）/（A11+A12+A13+A14+A15 +A21+A22+ A23+A24+A25 +A31+A32+A33+A34+A35）以及具有HPV16/18+结果的受试者百分比。

• 也应计算疾病患病率（≥CIN2）。

可以基于相应似然比的置信区间来计算≥CIN2的概率的置信区间。

HPV检测的临床性能应根据目标条件≥CIN3（或HSIL及以上，如果使用2级LAST系统）同法进行评估。

### (6) 辅助预期用途

**a. 一般研究设计选项**

根据2012年共识指南[参考文献23]，在30岁及以上的女性中，建议将HPV检测作为细胞学的辅助手段，主要是在细胞学正常的女性中。在细胞学正常的女性人群中建立您的器械的临床灵敏度和特异性较为复杂，因为这些女性在进行HPV检测时，由于其患宫颈癌的现有风险很低，通常不会被送去做阴道镜检查。然而，一小部分细胞学正常的女性会有宫颈异常（≥CIN2）[参考文献20]。HPV检测可能有助于鉴别一小部分细胞学正常的但患宫颈癌风险更高的30岁及以上女性。为了证明您的器械能够识别出这一小部分风险更高的女性，您应按照以下所述的分析方法估计该人群中≥CIN2的阳性与阴性个体的绝对风险和相对风险。预测这一目标使用人群的绝对风险和相对风险可以通过以下前瞻性临床研究设计中的至少一项来完成：

1. 通过您的试验用器械将细胞学正常的30岁及以上女性人群区分为阳性或阴性，并与有效的对照HPV检测器械（如FDA批准的HPV检测器械）或基线的PCR/测序建立一致性；然后每年随访这些女性，持续至少三年。有关HPV检测的前瞻性临床数据集的基线分析的更多详细信息，请参见上文第VII（A）（8）部分临床数据集中的HPV检测评价。所有在随访期间出现细胞学异常（≥ASC-US）的女性都应送去接受阴道镜检查，无论其HPV状态如何。与以下选项二不同，细胞学正常的女性不会按照这项研究设计送去接受阴道镜检查，特别是如果决定送去接受阴道镜检查是基于基线访视或随访期间的试验用或获批HPV检测结果[[3]](#footnote-3)（这对于避免偏倚很重要）。请注意，对于在研究期间任何时候有≥CIN2阴道镜检查结果的女性，随访将结束，这些女性被认为是“疾病阳性”。接受阴道镜检查但<CIN2的女性应在剩余的研究期间继续接受随访。随访数据应显示，与入组时经您的器械检测为阴性的女性相比，至少三年内检测为阳性的女性≥CIN2的相对风险存在统计学和临床上显著性差异。此外，对于在基线时经您的检测为阴性的女性，三年时≥CIN2的绝对风险应与95%置信区间一起评价。数据应证明，这一绝对风险足够低，可以确保您的检测可以安全地用于30岁及以上女性的辅助筛查。此外，说明≥CIN2的综合风险（不管基线时的HPV状态如何）。数据分析应按年龄组（30-39岁和40岁以上）分层。本项研究的纵向随访部分可能在批准后进行（有关更多详细信息，请参见下文纵向随访第VII（b）（6）（c）部分）。

2. 在基线时通过您的器械将细胞学正常的30岁及以上女性人群区分为阳性或阴性，然后将其中一小部分女性送去接受阴道镜检查。您还应与第二个研究设计选项的有效对照HPV检测器械建立一致性，但可以评价更小一部分的样本，因为您将获得更多有关基线时≥CIN2风险的信息。建议您将所有HPV阳性女性（通过试验用和/或获批检测）和随机的一小部分HPV阴性女性送去接受阴道镜检查。数据应显示，与入组时经您的器械检测为阴性的女性相比，检测为阳性的女性≥CIN2的相对风险存在统计学和临床上显著性差异。使用多重插补法，应计算经您的器械检测为阳性和阴性的受试者≥CIN2的绝对风险。对于用于检测和区分的HPV测试，数据还应证明，对于某些阳性结局，基线时≥CIN2的绝对风险足够高，可以证明该检测在目标使用人群中的有效性。由于只将对HPV阴性女性随机抽样送去接受阴道镜检查，数据存在验证偏倚，因此，应采用适当的统计方法（如多重插补法）[参考文献21]来计算绝对风险和相对风险。

**b. 针对辅助声明的“全队列”入组：**

请注意，目前FDA建议您将30岁及以上接受常规筛查的女性人群（“全队列”）入组到您的临床研究中，以评价辅助声明的执行情况。根据这项声明，女性在细胞学检查的同时进行HPV检测；因此，在辅助声明下包括细胞学级别更高的女性。FDA历来只允许申办者递交有关NILM ≥30女性的可操作数据，但FDA现在考虑：1）就针对检测的整体效果而言，在细胞学级别更高的女性（>ASC-US）中，HPV检测结果被证明是一项重要的安全信号；2）一项包括全队列≥30岁的研究规模包括大约3%的>ASC-US细胞学的女性，根据现行医疗实践，这些女性通常有阴道镜检查/活检结果；3）2012年指南包括了联合检测得到的HPV和细胞学结果的更多可操作组合。有鉴于此，FDA将评价所有细胞学类别，同时审评数据以支持辅助声明，进而确保HPV IVD器械的安全性和有效性。在“全队列”辅助研究人群中，细胞学检查≥ASC-US的女性应立即送去接受阴道镜检查。在辅助研究人群中，所有送去接受阴道镜检查但组织学检查没有≥CIN2的患者都应被邀请参加这项为期三年的纵向研究。

**c. 纵向随访**

考虑到在细胞学正常的女性人群中建立临床灵敏度和特异性需要非常大的样本量和/或长期的患者随访，FDA已经考虑了允许更快获得这些重要器械的选项，同时确保其安全性和有效性。FDA认为，如果一项HPV检测正在获得或已经获得ASC-US分流预期用途的批准，并且该检测已显示对宫颈癌前病变/癌症（≥CIN2）具有高度的临床灵敏度，则具有很高的置信度认为该检测的表现水平与目前对HPV检测的预期水平一致[参考文献2]。在这种情况下，为了获得同一HPV检测的辅助预期用途，FDA可以提供上文第VII（B）（6）（a）部分一般研究设计选项的选项1中描述的辅助研究的纵向随访部分以在上市后完成，只要已经证明，在前瞻性收集的NILM 30及更大（NILM ≥30）数据集中，通过试验用检测与比较产品检测进行的HPV检测与在ASC-US人群中进行的HPV检测相当。在这种情况下，将作为后批准研究的一部分，对前瞻性收集的NILM≥30数据集中已确定HPV检测特征的相同患者进行纵向随访，以确定该人群中经试验用HPV检测确定为阳性与阴性的患者癌前病变/癌症的累积三年风险。将考虑把这一方法用于检测根据现行临床应用指南支持在NILM ≥30人群中使用的HPV类型的测试[参考文献13]。请注意，此类器械的上市后研究仅在有关某些风险或受益的不确定性程度在器械于上市前批准时的综合受益-风险概况背景下可接受时才适用。此外，请参见FDA指南，标题为“按照PMA通知单实施的后批准研究的处理程序”

(http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm070974.htm).申办者应与FDA联系，讨论其是否有资格完成上市后纵向评价。

### (7) 辅助预期用途-用于检测和区分的HPV测试（HPV基因分型测试）

以上第VII（B）（6）部分辅助预期用途中所述的研究选项旨在确定细胞学正常的30岁及以上女性≥CIN2的相对风险，这些研究选项可以应用于二元结果的HPV检测（HPV为阳性或阴性）和多重结果的HPV分型测试（不仅可以检测到不同的HPV类型，还可以区分不同的HPV类型）。HPV基因分型测试的结果越多，证明每个结果的相对风险在统计学上有显著性差异的挑战性就越大。

根据2012年共识指南中的建议[参考文献23]，您可能希望进行HPV基因分型试验的另一个选项（除了更普遍的辅助筛查预期用途之外）是用于极高危型HPV基因型（如HPV16和18）的特定NILM ≥30阴道镜检查分流预期用途。这种类型的研究设计和评价的原则将非常类似于ASC-US分流，不同之处在于您将处理不同的研究人群和测试结果。如果您希望达到这样的预期用途，请联系FDA寻求进一步的帮助。

**a. 细胞学检查>ASC-US的30岁及以上女性中的HPV检测**

为了允许并行细胞学和HPV检测，辅助预期用途不需要仅限于细胞学正常的女性（即，不需要等待细胞学结果来安排HPV检测）。对于所有具有辅助预期用途的HPV器械，说明书和标签应表明细胞学检查>ASC-US的30岁及以上女性HPV结果为阴性时不应阻止女性接受阴道镜检查。

### (8) 初步筛查预期用途

2014年3月12日，举行了一次微生物学专家小组咨询会议，会议通过了一项新的HPV诊断器械适应症：初步宫颈癌筛查。如果您有兴趣进行初步筛查，我们建议您查看本次会议的相关信息，这些信息可登录CDRH网站查询：

https://wayback.archive-it.org/7993/20170405192832/https:/www.fda.gov/AdvisoryCommittees/CommitteesMeetingMat erials/MedicalDevices/MedicalDevicesAdvisoryCommittee/MicrobiologyDevicesPanel/ucm388 531.htm。

为了评价HPV初步筛查适应症，您应在基线时经您的器械将接受常规筛查（全队列方法）的25岁及以上女性区分为HPV阳性或阴性，然后将其中一小部分女性送去接受阴道镜检查。建议您将所有HPV阳性女性（通过试验用和/或获批检测）、细胞学检查阳性和随机的一小部分HPV阴性的细胞学正常女性送去接受阴道镜检查。细胞学结果不令人满意（UNSAT）的女性也应送去接受阴道镜检查，以根据HPV检测结果分层评估这些女性的患病风险。

这些数据应证明，与公认的宫颈癌筛查方法相比，使用您的器械进行初步HPV筛查在检测≥CIN2和≥CIN3（灵敏度、特异性、PPV值、NPV值、绝对风险和似然比）方面具有可接受的临床性能。13、23、24和25]。对于预期用于检测和区分的测试，数据还应证明，阳性结果基线时≥CIN2的绝对风险足够高，而阴性结果基线时≥CIN2的绝对风险足够低，以证明该测试在目标使用人群中的有效性。由于只将对HPV阴性女性随机抽样送去接受阴道镜检查，数据将存在验证偏倚，因此，应采用适当的统计方法（如多重插补法）来计算绝对风险和相对风险[参考文献21]。

**a. 纵向随访**

在初步筛查研究人群中，所有接受阴道镜检查但经CPR评定没有组织学检查≥CIN2的患者都应被邀请参加这项为期三年的纵向研究。随访研究中的受试者应接受年度访视，以对宫颈取样进行细胞学检查，所有≥ASC-US的受试者都应被邀请进行阴道镜检查。如上文第VII（B）（3）（b）部分组织学审查所述，应以标准化方式进行阴道镜检查和活检。所有的宫颈活检都应由CPR专家小组进行检查。所有经CPR认定为≥CIN2的受试者应退出研究，而那些经CPR认定为<CIN2的受试者都应被邀请进行下一年的随访。为了最大限度地探查疾病，建议在第三年对所有随访受试者考虑进行出口阴道镜检查，如果需要，还可以进行颈管搔刮术（ECC）。

在一项平行纵向研究中，您应考虑随机入组一小部分细胞学和HPV阴性的女性（通过试验用器械和至少一个FDA批准的器械），并且在基线时未被选定接受阴道镜检查，其中这些女性在3年筛查间隔后被送去接受阴道镜检查。由此可以在3年筛查间隔内更准确地评估这些女性的≥CIN3风险。以这种方式获得的≥CIN3的3年风险估计值不会受到基线时CIN2病变的检测和治疗的影响。

**b. 初步筛查研究中的盲法问题**

研究者、患者和临床医生（包括那些进行阴道镜检查和组织学检查的人员）在阴道镜检查/组织学检查完成之前应就患者的HPV状态及其细胞学状态设盲，以避免研究中的偏倚。应将患者标记为需要进行阴道镜检查/组织学检查，但不指定与转诊相关的检查结果。

细胞学家故意对初步HPV筛查研究的所有其他患者的测试结果设盲，以避免基于对其他测试结果的了解对细胞学切片的评估造成偏倚（否则，仅将细胞学表现作为比较器算法可能会有潜在偏倚）。然而，在现实生活环境中，当细胞学家知道其正在筛查的样本的HPV状态时，使用HPV检测作为主要筛查器械的情况下，细胞学表现可能会有所不同。为了评估HPV初步筛查与试验用器械在现实生活环境中的表现可能存在的差异程度，应在了解重复查看时HPV状态的情况下，在试验机构重新查看一小部分细胞学切片。应确定这种不设盲法对您的HPV初步筛查器械性能的影响。

**c. 受益-风险分析**

您应评价您的HPV初步筛查器械检测高级别宫颈疾病（CIN2，≥CIN3）相对于现用筛查方法的受益和风险。为了允许评价受益-风险，您应提供对您的器械和现行筛查方法的测试和程序预期次数（细胞学、HPV检测和阴道镜检查程序的次数）的估计值，以及每10,000名接受筛查的女性中的真阳性、假阳性和假阴性的预期数量。关于细胞学家对HPV结果的了解，在执行此项分析的应同时考虑HPV初步筛查的设盲法和不设盲法二者的表现评估。有关更多信息，请参见FDA指南，标题为“在医疗器械上市前批准和重新分类中做出受益-风险决定时要考虑的因素”，网站为

(http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM517504.pdf).

**d. 在女性癌症患者中的表现**

寻求获得初步筛查预期用途的申办者应确保其检测不仅对宫颈癌前病变（如CIN2和CIN3）高度灵敏，而且对宫颈癌本身也高度灵敏。因此，应使用来自美国的储存样本，对从之后被诊断为宫颈癌的女性患者中收集的细胞学样本利用试验用器械进行额外检测。我们建议将这项研究的单独方案递交给FDA，以使用FDA的预递交计划进行审评。有关FDA预递交计划使用方法的信息，请参见FDA指南，标题为“医疗器械递交的反馈申请：美国食品药品监督管理局工作人员举行的上市前申报计划和会议》。

（http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/UCM311176.pdf）在您的方案中，请提供有关收集这些样本的信息，并详细说明您计划如何对这些样本进行设盲。

**e. 一般考虑事项**

尽管上文提供了HPV初步筛查研究的基本要素，但这类研究很复杂，故强烈建议任何寻求获得HPV初步筛查适应症的申办者都应通过预递交计划向FDA递交详细的临床方案以供审评。

### (9) 涵盖所有三项HPV检测预期用途的研究设计（ASC-US分流、辅助筛查和HPV初步筛查）

请注意，上述评价HPV初步筛查预期用途的研究设计也可用于评价ASC-US分流和辅助筛查预期用途，以及额外需要入组细胞学检查为ASC-US的21-24岁女性。可以在了解细胞学结果后邀请这些患有ASC-US的年轻女性参加此项研究，因此在一项研究中评价所有三项HPV检测声明所需的额外女性人数将最少（即超过初步筛查声明所需的人数）。请参见上文第VII（B）（4）部分ASC-US分流预期用途下的建议，以了解根据细胞学结果（特别是关于这些标本来源的建议）评价入组女性人群的ASC-US分流性能时的考虑事项

## C. 对照

在进行上述性能研究时，我们建议您在分析和临床研究期间每天对检测进行适当的外部对照。由于HPV不容易培养，在尽可能接近临床标本的基质中，适当的外部对照包括质粒中包含的HPV基因组DNA或合成HPV RNA转录本（取决于您的检测靶标是HPV DNA还是RNA）。选择用于您的对照的HPV基因型应是最具临床相关性的HPV基因型（例如，HPV 16）。由于疫苗接种计划改变了HPV毒株的临床意义，可能需要重新评估适当的控制序列。

我们建议您在为您的器械设计特定对照时咨询FDA。如果您的器械基于核酸技术，我们建议您包含以下类型的对照：

### (1) 外部对照

**a. 阴性对照**

阴性外部对照包含适当的缓冲液或样本运送培养基，并以与临床标本相同的方式贯穿整个检测过程。该对照用于排除扩增和/或检测反应中靶核酸的污染或背景增加。

**b. 阳性对照**

阳性外部对照在适当的缓冲液或样本运送培养基中含有的靶核酸水平大约高于检测的C95浓度的两倍，并以与临床标本相同的方式贯穿整个检测过程。对于靶HPV DNA的检测，将HPV 16基因组克隆到悬浮在样本运送培养基中的载体质粒DNA中将是一种合适的对照。HPV 16基因组的完整靶向保守区，如L1区，也可以用来代替全长基因组克隆。对于靶HPV RNA转录本的检测，悬浮在样本运送培养基中的靶基因的合成全长转录本将是一种合适的对照。对于分析物水平不足以挑战医疗决策点的对照，作为确保符合21 CFR 809.10（b）（8）（vi）的一部分，标签中应包括以下警告：

“阳性对照和阴性对照旨在监测试剂的实质性失效。阳性对照不应作为临界值精密度的指标，只能确保试剂的功能性。质量控制要求必须符合当地、州和/或联邦法规或认证要求以及您实验室的标准质量控制程序。”

对于不希望提供外部对照的制造商，应在包装内使用说明书中包含说明，以指导终端用户如何制作自己的外部对照。此选项仅适用于包括所有样本的内部阳性对照且没有初步筛查声明的器械。

### (2) 内部对照

内部对照是与靶核酸共处理（即提取和扩增）的非靶核酸序列。其控制试剂（聚合酶、引物等）的完整性、设备功能（热循环仪）以及样本中抑制剂的存在。可接受的内部对照材料示例包括与HPV共处理的人类核酸和扩增人类管家基因的引物（例如，RNaseP、P-actin）。对人类“管家”基因的内部对照也可能有助于确保对等分材料进行充分的细胞取样。所有具有初步筛查声明的HPV器械都需要这种类型的对照，以帮助降低假阴性结果的可能性；否则，应根据器械的具体情况确定是否需要这种对照[参考文献22]。

# VIII. 参考文献

1. Bernard HU、Burk RD、Chen Z、van Doorslaer K、zur Hausen H、de Villiers EM。基于189种PV类型和分类提案修正案的乳头状瘤病毒（PV）分类。病毒学。2010; 401(1):70-79.

2. Walboomers JM、Jacobs MV、Manos MM、Bosch FX、Kummer JA、Shah KV、Snijders PJ、Peto J、Meijer CJ、Munoz。人乳头状瘤病毒是全球范围内浸润性宫颈癌的必要原因。病理学杂志。1999; 189(1):12-19.

3. Munoz N、Bosch FX、de Sanjose S、Herrero R、Castellsague X、Shah KV、Snijders PJ、Meijer CJ、国际癌症研究机构多中心宫颈癌研究组。与宫颈癌相关的人乳头状瘤病毒类型的流行病学分类。新英格兰医学杂志。2003; 348(6):518-527.

4. 美国临床和实验室标准协会。2012.临床实验室测量程序的检测能力评价；获批指导原则-第2版。EP17-A2.

5. Linnet, K.和Kondratovich, M. 确定检出限的部分非参数方法。临床化学。2004; 50(4), 732-740.

6. Weusten J.J.一种评估存在假阳性结果情况下的诊断检测分析灵敏度的统计方法。病毒学方法杂志；151（2）：301-10。

7. 美国临床和实验室标准协会。2014.定量测量程序的精密度评价；获批指导原则。EP05-A3.美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

8. 美国临床和实验室标准协会。2002.定性测试性能评价的用户方案；获批指导原则。EP12-A2.美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

9. 美国临床和实验室标准协会。2014.精密度的用户验证和偏倚的估计；获批指导原则。EP15-A3.美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

10. 美国临床和实验室标准协会。2005.临床化学中的干扰测试；获批指导原则。EP07-A2.美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

11. Haeckel R.关于临床化学中携带污染效应的描述和测量的建议。纯粹与应用化学1991年；63:301-306。

12. 美国临床和实验室标准协会。2009.体外诊断试剂的稳定性评价；获批指导原则。EP25-A.美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

13. Wright T、Massad L、Dunton C、Dunton J、Spitzer M，Wilkinson E等人。子宫颈癌筛查异常妇女处理的共识指南（2006版）。《美国妇产科杂志》。2007; 197(4):346-55.

14. Nayar R，Wilbur DC，eds。Bethesda宫颈细胞学报告系统。定义、标准和说明性注释。第3版，Springer；2015年。

15. Schiffman M、Clifford G、Buonaguro F。弱致癌性人乳头状瘤病毒类型分类；解决流行病学的边界极限。传染性病原体和癌症。2009; 4:1-8.

16. 美国临床和实验室标准协会。2008.多重核酸检测的验证和确认：获批指导原则。MM17-A.美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

17. Schiffman M、Rodriguez AC。CIN3诊断中的异质性。柳叶刀肿瘤学2008; 9(5):404-6.

18. Linnet K.、Brandt E.。一旦选定最佳临界值，就评估诊断性检测。临床化学。1986; 32(7):1341-6.

19. Kondratovich M、Yousef WA。同一研究中诊断器械的准确性和“最佳”临界值的评价。联合统计会议。2005.ASA流行病学统计学部分，第2547-2551页。

20. Khan MJ、Castle PE、Lorincz AT、Wacholder S、Sherman M、Scott DR、Rush BB、Glass, AG、Schiffman M。人乳头状瘤病毒（HPV）16或18女性患者宫颈癌前病变和癌症的10年风险增加，以及特定类型HPV检测在临床实践中的可能效用。国家癌症研究所杂志。2005; 97(14):1072-79.

21. Kondratovich M。当参考标准无法通过两项检测获得阴性结果时，比较两项医学检测。《生物药剂统计学杂志》。2008; 18(1):145-66.

22. 临床和实验室标准协会。2015传染病分子诊断方法；第3版。MM03-Ed3。美国临床和实验室标准协会，Wayne PA。

23. Massad LS，Einstein MH，Huh WK等人，2012。关于异常宫颈癌筛查试验和癌前病变管理的更新版共识指南。《产科学与妇科学》。2013; 121(4):829-46.

24. Saslow D，Solomon D，Lawson H等人。美国癌症协会、美国阴道镜和宫颈病理学会以及美国临床病理学会宫颈癌预防和早期检测筛查指南。《美国临床病理学杂志》。2012; 137(4):516-542.

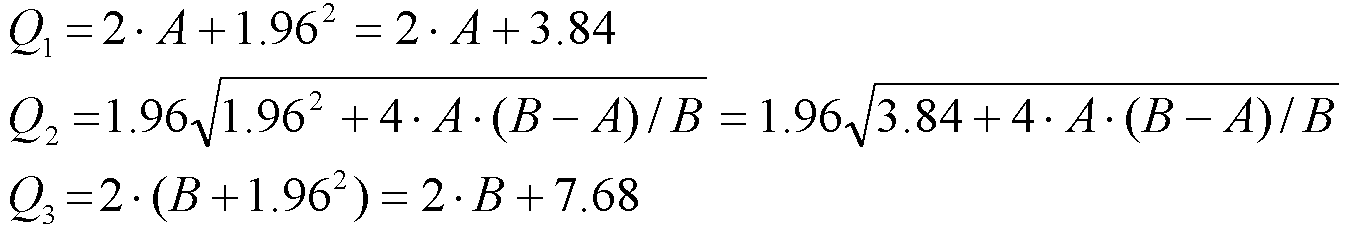
25. Darragh TM，Colgan TJ，Cox JT等人。HPV相关病变的下肛门生殖器鳞状上皮术语标准化项目：背景和来自美国病理学家学院和美国阴道镜和宫颈病理学会的一致建议。 《下生殖道疾病杂志》。2012;16(3):205-42.

# IX. 附录 - 统计学分析

**计算百分比和比例的评分置信区间**

以下是进行百分比或比例统计学分析的其他建议。有几种不同的方法可用。我们建议采用Altman等人描述的评分法（Altman D.A.，Machin D.，Bryant T.N.，Gardner M.J.eds。“统计学数据和置信水平”。《英国医学杂志》第二版；2000年）或Clopper-Pearson法（Clopper CJ，Pearson E。“二项式方法演示的置信水平或置信界限的使用”。《生物统计学》，1934年；第26期：第404-413页）。 评分法的优点是它具有更好的统计特性，并且可以直接计算。评分置信界限往往会产生比Clopper-Pearson置信区间更窄的置信区间，从而产生更大的置信下限。因此，当n=70个样本且65/70=92.9%时，双侧95%置信区间的评分下限为84.3%。相比之下，Clopper-Pearson置信下限为84.1%。本文件演示了如何使用评分法报告置信区间。为方便起见，我们在此提供百分比评分置信区间的公式。

比例A/B的双侧95%评分置信区间计算为：[100%（Q1-Q2）/Q3，100%（Q1+Q2）/Q3]，其中，值Q1、Q2和Q3根据下列公式计算而得。对于比例A/B：



在上述公式中，1.96是标准正态分布的分位数，对应于95%的置信水平。

例如，如果比例为（65/70），Q1=133.84，Q2=9.28，Q3=147.68，则双侧95%评分置信区间为84.3%至96.9%

**基于似然比（患病率为常数）的置信区间计算阳性预测值（PPV）和阴性预测值（NPV）的置信区间**

PPV为（1+PLR-1\*（1-π）/π）-1，其中，PLR为阳性似然比（PLR=se/（1-sp））；NPV为（1+NLR\*π/（1-π））-1，其中，NLR为阴性似然比（NLR=（1-se）/sp），π为患病率。对于似然比的95%置信区间的计算，计算两个独立比例比值（PLR为Se估计值比（1-Sp）估计值，NLR为（1-Se）估计值和Sp估计值）的置信区间。有几种不同的方法可用于计算似然比的置信区间（见Altman D.A.，Machin D.，Bryant T.N.，Gardner M.J.eds。“统计学数据和置信水平”。《英国医学杂志》第二版；2000年，第18-110页）。我们建议采用Nam所著论文（Nam J.。基于似然评分的两个二项式比例比值的置信界限：非迭代法。《生物医学杂志》。1995年；第37期：第375-379页）中描述的评分方法。使用相应似然比的95%置信区间，很容易计算出相应预测值的95% CI，其中π（患病率）为常数。

**备注：**

假设[L，U]是b的1-r水平置信区间，并假设G是定义在参数空间上的函数。

如果G增加，则[G（L），G（U）]是G（b）的1-r水平置信区间。

如果G减小，则[G（U），G（L）]是G（b）的1-r水平置信区间。

（当π为常数时，（1+x1\*（1-π）-1和（1+x\*π/（l-u））-1是单调函数。）

1. 如果精密度研究中临界值（C50）周围浓度的标准差（SD）几乎恒定，则：C95 = C50 +1.645 x SD，以及C5 = C50 - 1.645 x SD。如果精密度研究中临界值（C50）周围浓度的变异系数（CV）几乎恒定，则：C95 = C50 + 1.645 x CV x C95，以及C5 = C50 – 1.645 x CV x C5。基于此，C95 = C50 / （1 – 1.645 x CV），以及C5 = C50 / （1 + 1.645 x CV）。 [↑](#footnote-ref-1)
2. 请注意，对于本文件中要求提供≥CIN2目标条件数据的所有地方，也应提供≥CIN3目标条件的数据，因为≥CIN3更有可能进展为宫颈癌。如果您使用的是2级LAST系统，您还应提供HSIL及以上的数据。LAST系统中的HSIL与2014 Bethesda宫颈细胞学报告系统中的HSIL不同，这种区别应通过为每个包含“HSIL”结果的表格注明是否报告细胞学或活检结果来明确。 [↑](#footnote-ref-2)
3. 例外情况是，如果一名女性患者在细胞学检查中两次阴性且HPV阳性（在连续年度访视中）-在这种情况下，其应根据2012年共识指南被送去接受阴道镜检查。[参考文献23]。在这种情况下造成的偏倚不可避免，因为患者的健康最重要。 [↑](#footnote-ref-3)