**使用酶联免疫测定（Eia）、酶联免疫吸附测定（Elisa）、颗粒凝集试验以及激光和速率比浊法评估类风湿因子（Rf）体外诊断器械的审查标准**

本指南编写于1997年2月27日实施FDA的良好指导规范（GGP）之前。其不会为任何人创造或赋予任何权利，也不对FDA或公众具有约束力。如果替代方法满足适用的法律、法规或其两者的要求，可以使用替代方法。本指南将在下一版本中更新，以纳入GGP的标准部分。

**本文件旨在为编制法规提交资料提供指南。其不以任何方式约束FDA或受管制的行业。**

免疫学科

临床实验室器械部

器械管理处

文件发布日期：1997年2月21日

虽然本指导性文件可作为最终文件，但可以随时以书面形式提交评论和建议，供部门审议，提交地址：Peter Maxim，Ph.D.，免疫学主任（HFZ-440）。如果有与本指南的使用或解释有关的问题，请联系：Peter Maxim，Ph.D.，免疫学科主任，电话：（301）594-1293。

卫生与公众服务部

公共卫生署

食品药品监督管理局

器械与放射健康中心

**使用酶联免疫测定（Eia）、酶联免疫吸附测定（Elisa）、颗粒凝集试验以及激光和速率比浊法评估类风湿因子（Rf）体外诊断器械的审查标准**

这是一个灵活的文件，表明当前有关采用EIA、ELISA、凝集和激光或比率比浊法的类风湿因子（RF）体外诊断器械的关注和建议。其基于（1）当前的基础科学，（2）临床经验，（3）1990年安全医疗器械法（SMDA）和（4）联邦法规（CFR）中的FDA法规。随着科学和医学的进步，这些审查标准将根据需要重新评估和修订。

**目的**

本文件旨在针对用于检测和/或定量临床样本中RF的器械许可上市之前须送交食品药品监督管理局（FDA）的信息提供指南和说明。对于用于检测或定量RF同种型（而非IgM）的器械，可能需要提交额外数据。

**定义**

这种通用器械类型旨在用于临床实验室或医生的办公室实验室\*，作为通过EIA、ELISA、颗粒凝集试验和激光和速率比浊法对RF进行定性、半定量和/或定量测量的体外诊断试验。

\*已提交附加数据以证明器械在这些环境中的性能时，器械可经过许可用于替代试验站点。

**产品代码：** DHR

**法规编号：** 21 CFR 866.5775 类风湿因子免疫试验系统。

说明。“类风湿因子免疫试验系统是由用于通过免疫化学技术测量血清、其他体液和组织中的类风湿因子（对免疫球蛋白的抗体）试剂组成的器械。类风湿因子的测量可帮助诊断类风湿性关节炎”。

分类： II类 （性能标准）

面板： 免疫学 （82）

所需审查： 上市前通告 （510（k））

**I. 临床适应症/显著性/预期用途**

**A. 引言**

类风湿因子是任何同种型的免疫球蛋白，其具有抗体活性，可直接作用于人类或动物免疫球蛋白G（IgG）Fc区上的抗原部位。在Waaler1的发现和Rose及其同事2的独立再发现后，取自患有类风湿性关节炎的患者的血清凝集涂有兔抗绵羊红细胞抗体的绵羊红细胞，确定造成凝集的血清因子是 IgM类的高分子免疫球蛋白。IgM-RF是通过用于RF检测的临床可用诊断测定鉴定的主要同种型。RF测定是最广泛使用的血清学试验，帮助诊断类风湿性关节炎（RA）。1,2

个体发生类风湿性关节炎时，最一致的血清学发现是血液和滑液中的RF浓度增加。1,2 据报道，约有70-80％确诊为RA的患者中存在RF。当疾病处于最严重状态时，RF的浓度趋向于最高，并且在长期缓解期间趋于减少。在RA病例中，这种高RF频率使得对其进行的检测可用作诊断工具，然而这些因素并非类风湿性关节炎所特有。在1％到4％的普通人群中可发现存在RF。RF存在于75％的成年患者中，其中，在年龄高于65岁以上的人中，RF发生率最高，且几乎所有患有Felty和Sjogren综合征的患者中均存在RF。滴度增加后，可能出现各种急性免疫反应，特别是病毒性感染和许多其它疾病（感染性单核细胞增多、结核病、麻风病、各种寄生虫病、肝病、结节病和系统性红斑狼疮）。6

据报道，在类风湿性关节炎患者中，IgM、IgG和IgA RF的水平均升高。几个研究小组已报道称，高水平的IgA RF是出现更严重疾病结果的预兆。7,8,9将RF同种型水平与关节的放射性异常进行比较时，最强的相关性与IgA RF水平升高有关。在症状发作3年内，如果IgA RF的水平持续较高，则其可能在症状发作6年后导致更严重的疾病。 9 早在1984年就有文献表明，如果在早期疾病中检测到IgA RF，则指示一种不良预后，此时则需要更积极的治疗过程。10

一些研究表明，与IgM RF相比，IgG RF与疾病状态更具相关性。两个不同小组证明，IgG抗球蛋白的水平升高实际上仅仅可在类风湿性关节炎患者的血清中发现，而在其他关节炎患者的血清中并非发现这一现象。12,13似乎RA血管炎与IgG RF最具临床相关性。 11,12

用于测量RF-IgM的常规方法取决于涂有人类或动物IgG的颗粒（例如乳胶、木炭、皂土或红细胞）的凝集。乳胶凝集试验的灵敏度较高，但其可生成较多的假阳性。21取自正常个体的血清使胶乳颗粒非特异性凝集的现象并不罕见。22 定量血清学试验（如EIA，RIA和比浊法）具有客观工具测量单样本稀释的优势。

**B.说明：**

可以提供包括以下内容的简明讨论。可使用关键文献引用支持讨论。

1.临床适应症、显著性和预期用途。

2.所涉风湿病的背景说明，包括受影响人群的类型（性别、年龄等）。

3.阳性结果的显著性（疾病适应症和随访试验）。

4.假阳性和假阴性结果的显著性。

5.用于检测抗体的所有试验方法的简要历史总结。

6.与其他可用方法相比，器械方法的优点/优势和限制/缺点。

7.模型。

**II. 器械说明：**

实质等同性的测定基于特定的预期用途（检测到何种分析物和适应症）和器械中使用的技术/方法。讨论器械方法的原理，以及此类原理是否已经确定或为未经证实的新原理。

**A. 酶联免疫测定（EIA）或酶联免疫吸附测定（ELISA）**

EIA或ELISA用于定性、定量或半定量测定人血清中的IgM RF。将纯化的RF抗原（人IgG）连接到聚苯乙烯微量滴定板的孔中。在室温下将稀释的患者样本、对照物和校准物置于微孔中温育。存在的任何RF-IgM抗体可结合固定的人IgG以形成抗原-抗体复合物。从孔中洗去未结合的抗体，并加入酶标记的抗人IgM。酶标记物可结合抗原-抗体复合物。洗去过量的标记物并加入特定基质。已结合的酶标记物开始可引起显色的水解反应。在规定时间后，反应停止。

所生成的颜色强度与结合到孔上的RF特异性IgM抗体的量成比例。在分光光度计（ELISA读数器）上读取结果。通过从涂有抗原的微孔的吸光度值减去样本空白的吸光度值来计算净吸光度。然后将使用每个滴定板测定的校准标准用于根据净吸光度值计算RF-IgM活性（以IU./mL为单位）。

**B. 颗粒凝集试验**

早期试验和那些在临床上应用最广泛的试验依赖于IgM类RF的凝集性质。IgG（通常是人IgG或兔IgG）与颗粒载体结合，然后通过相应指标系统的凝集或絮凝检测RF是否存在。常用的载体颗粒包括胶乳、木炭、皂土以及红细胞。

用于测定血清抗体含量的半定量分析包括血清双倍稀释和端点测定（可以观察到凝集的最后一次双倍稀释）。这种稀释度的倒数被称为“抗体滴度”。

**C. 激光和速率比浊法**

在抗体过量条件下混合抗原和抗体可使形成抗原-抗体复合物，其浓度可以通过光色散测定。当光束通过含有固定量的抗体和可变浓度的抗原的导管时，在导管中形成的免疫复合物的浓度将决定光色散的程度。将从0°至90°间的角度测量散射的光量。由于抗体浓度保持恒定，散射的光与混合物中抗原的浓度成比例。

**III. 临床和非临床实验室研究：具体性能特性：**

FDA要求上市体外诊断器械的上市前通告申请中提供不同类型和数量的数据和统计分析。所要求的数据的数量和类型取决于新器械的预期用途、技术特性、试验为定性试验还是半定量试验以及制造商做出的某些说明。

应用数据支持与使用该器械有关的实质等同性和具体性能特性声明。建议纳入用于体外试验的所有方案。试验数据结果应有分析和结论。结果概述和非预期结果的说明以及所执行的任何额外试验可有助于成功申请。适当时，图表（散点图、直方图等）可以用作分析和结论的一部分。

**A. 分析/实验室/体外研究**

1. **临界点确认**

用以显示测定如何测定临界点（阳性和阴性或医疗决策限度之间的区别）的描述性信息和实验室数据极为重要。

a.应使用以下参数定义所使用的人群：

i.正常人群中的样本数（用于确定初始筛选稀释），其中，根据性别和年龄组对样本进行归纳。16

ii.每个疾病组中包括的样本数，其中，疾病组按性别和年龄组归纳。

iii.人群所来自的地理区域。

iv.人群特性的图形（例如，散点图、直方图）表示。

b.建议说明用于确定临界点的统计方法。

c.如果使用未定区段，应对未定区段的基础进行定义。

1. **试剂表征**

a.简要说明测定中使用的抗原和抗体。说明需简化并可描述特性。

b.如果在制备抗原时使用任何重组技术，则需说明所用方法。

1. **测定特异性/干扰物质**

应该评估在特定样本类型或条件（例如溶血、脂血症、微生物污染、存在其他分析物或其他自身抗体、以及储存或冻融）中遇到的潜在交叉反应或干扰物质。当干扰物质对结果具有影响时，应告知用户不应测试含有这些物质的样本。

a.应使用基于样本储存稳定性研究的最佳条件。对假阳性和阴性进行评估（如适用）。

b.如果要求使用血浆，则需提交数据以证明推荐使用的每种抗凝剂不干扰测定。

i.对于每种抗凝剂，应当对10个在临界点为阳性的匹配血清和血浆样本进行测试。

ii.类似地，建议对10个匹配阴性血清和血浆样本进行测试。如果测定具有较高的稀释因子（例如，1：100），则可能无需说明这些研究。

c.说明是否可能出现其他自身免疫抗体的干扰。

d.如果测定工具盒使用小鼠单克隆抗体，请警告来自接受用于诊断或治疗的小鼠单克隆抗体制剂的患者样本可能含有人抗小鼠抗体（HAMA），并且测试时可能显示假性升高或降低值。

e.建议在尝试测量IgG-RF时对高水平IgM RF和/或IgA RF（前带或钩状效应）是否可产生干扰进行讨论。

1. **性能特性**

请纳入以下性能特性：

**a.** **分析灵敏度（如适用）**

分析灵敏度或检测限的定义为从零区分的最低量（通常使用高于零位控制平均值的95％置信区间或2个标准偏差（SD））。 16,17 零标准（零稀释剂）可以在同一次运行中运行至少20-25次，并对零标准平均值和平均值的2 SD（计数，OD等）进行计算。如果分析物水平较低且不具临床意义，则检测限的确定可能与试验无关。

**b. 相对灵敏度和特异性**

应在包装说明书中的性能特性部分中确定并报告通过与合法销售的RF器械或参考方法进行比较确定的相对灵敏度和特异性。

**c. 线性范围**

应确认测定的线性范围，其中正常和异常样本应可覆盖整个可报告的测定范围。 18

**d. 重现性和重复性研究** 16，17，18，19，20

对照应模拟患者样本或实际患者运行，代表至少两个临床显著水平（该水平邻近每日医疗决策限度（正常或升高），共20日），从而允许单独估计日间、运行间和日内标准偏差（SD）以及运行内和总SD。

**i. 定性/半定量试验：**

在具有滴定形式的器械中，例如，乳胶凝集测定，建议运行内的重现性应位于公认的增减一倍、两倍稀释的限度内。

**ii. 定量试验：**

每组值的不精确性的总、日间和日内以及运行间和运行内的平均值和变异系数也可有助于试验。

**iii. 平均值，SD和变异系数：**

根据样本重复的次数，建议在包装说明书的性能特性部分中纳入适当平均值、SD和/或变异系数以及置信水平。每日的运行次数也可有助于试验。

**e.前带或高剂量钩状效应研究**

测试具有最高滴度、连续稀释和未稀释的样本。如果遇到前带问题，包装说明书中的性能特性部分应说明检测到前带问题时的滴度，以及用户应遵循纠正问题的程序。在适当情况下，简要说明主动试验的前带反应。

**f. 替代试验站点**

请纳入在这些环境中进行的重现性研究。建议针对新技术进行的现场试验至少包括三个独立的替代试验站点。在三个站点中的每一个处，应可对器械的精确性和精确度进行评估。应由现场人员和专业实验室人员对统计上数量有效的分组样本进行测试，并比较结果，确定预期用户使用时器械的性能。

1. **对比研究**

将新器械与合法销售的器械进行比较。请纳入合法销售器械的包装说明书。

如果在新器械和合法销售的器械之间存在较大的方法/技术差异，则将使用公认的参考方法（如果可用）来进行比较，公平评估拟定器械的性能特性。

**a. 定性/半定量试验：**

建议对足够数量的阳性和阴性样本进行研究以使其在统计上具有显著性。（统计学家可以建议适当数值。）将器械与合法销售的比较器械进行比较的数据可以以2×2表格展示。

**b. 定量试验：**

只有当公认参考材料（其浓度已知）可用于对测定中计算结果的校准物或参比物进行标准化时，测定才被视为定量测定。

如果新器械中使用与比较器械中相同的参考材料来证实定量声明，则可以提交对比数据，显示参考材料用作样本时两个测定之间的相关性。由新器械和比较器械测定的并经过连续稀释的参考材料应当显示相等结果。

对使用不含干扰物质的阳性RF样本获得的结果进行对比，其中，样本取自至少40人，且该人群应覆盖整个测定范围（抗体水平从低到高）。19,21 如果分析属于定量类，则将器械与比较器械进行比较的线性回归可有助于试验。

**c. 对比差异：**

可以使用临床诊断或其他合法销售的器械来解决新器械和比较方法之间的可疑结果或差异。

1. **样本采集和处理条件**

在包装说明书中说明样本采集、储存和处理条件，并在提交资料中提供数据或适当的参考资料来证实声明。

1. **计算机控制医疗器械**

有关计算机辅助临床实验室器械的信息，参考“接受510（k）审查的计算机控制医疗器械的审查指南”，其可从小型制造商援助司（DSMA），1-800-638-2041获得。

**B. 临床研究**

在某些情况下，可能需要临床数据来确定安全性和有效性。在某一器械类别中引入新的或不常见的方法、技术特征或对分析物的修改（例如RF的同种型（除IgM RF外））时，为支持有关实质等同性的声明，必须对临床性能进行证实。

对于510（k）提交，请在三个独立临床中心进行临床研究。其中一个中心可位于制造商的工厂。研究者应根据机构名称和地址确定。

1. **充分的临床研究**

a.实验设计应足以证明与使用该器械有关的预期用途和具体性能参数的所有声明。

如果测量除IgM以外的RF同种型，提供参考文献来解释临床意义。建议提供临床数据来支持这些声明。声明同种型水平和临床疾病活动之间的相关性。

b.说明用于临床研究的所有方案，并确定监测，确保所有中心始终遵循方案。

c.在开始研究之前确定样本量，其在统计学上应足以支持试验假设。

d.采样方法：说明用于选择和排除患者的采样方法。

i.患者选择：

请纳入取自患有可能导致假阳性或假阴性结果的疾病或病症的个体的样本。理想情况下，优选使用前瞻性研究。然而，如果使用回顾性研究，请纳入符合方案中规定的患者选择标准的所有符合条件的患者。

ii.说明所有患者和样本。确保已纳入每个患者中每个样本的数据点。

1. **确定参考范围**

**a. 正常个体：**

使用统计上数量足够的样本确定正常的参考范围，其中，样本取自以年龄、性别、地理位置以及将影响所获得值的任何其他因素为特征的正常人群。

**b. 患者组：**

i. 确认新器械可检测器械所适用的每种疾病通常预期阳性百分比。使用统计上数量足够的患者，其以年龄、性别、地理位置、疾病的任何症状、临床表现以及将影响所获得值的任何其他因素为特征。22,23

ii. 假性结果：

酌情提供每种疾病的假阳性和假阴性结果的报告（ 如适用）。

**c. 所声明的样本类型：**

除非其他数据可证明预期用途声明中所声明的所有样本类型之间没有差异，否则应对所有样本类型进行研究。

**IV. 标签考虑**

以下是法律【502（f）（1）】和法规【21 CFR 809.10（b）】中某些要点的补充细节。

**包装说明书**

请在510（k）提交资料中纳入新RF器械的包装说明书草案。引用关键文献来支持整个文档中的声明。

**A. 预期用途**

基于器械中使用的技术/方法简要说明预期用途。包括以下信息：

1. 测定为定性测定、定量测定还是半定量测定。请注意，为声称已提供定量结果，必须根据参考材料（其值已知且已确定）对校准物或参比物进行校准。
2. 样本类型。
3. 说明该器械是否用于临床实验室和/或替代性护理站点。“限制”部分应包括试验性能所需的任何特定培训。

典型的预期用途声明为：

“ABC的\*\*\*试验系统是用于通过比浊法定量人血清中的RF的体外诊断器械，并且用于帮助诊断类风湿性关节炎。

**B. 质量控制（QC）**

包装说明书应推荐质量控制样本的水平及其数量、模型类型、位置和解释，以确保系统满足其性能声明。请声明，如果控制措施未按预期发挥作用，则测定结果应被视为无效，应该重复进行测定。

应以与患者样本相同的方式处理对照组。例如，如果患者样本被稀释或滴定，则对照物质也应当使用相同的稀释液进行稀释或滴定。

**C. 结果**

详细说明预期结果和解释

1. **EIA 或ELISA**

a.说明用于计算未知值的程序，包括样本计算。

b.说明用于确定临界值的程序，并说明获得未定值时应该采取的行动（例如，应该在不同的测定系统中重新测试或分析样本）。

c.说明对高于测定线性的样本进行重新测定的程序。给出稀释样本的说明，包括稀释因子和须使用的稀释液类型。

1. **颗粒凝集试验**
2. 如果试验为半定量试验，说明用于确定阳性样本滴度的程序。

b.说明定性筛选方法应检测到的最低RF水平。

c.清楚说明阳性结果的内容。

1. **激光和速率比浊法**

a.说明比浊计的测量范围，并给出对超过此范围的样本进行稀释的说明。

b.如果工具未计算结果，则纳入可能需要执行以得出结果的任何计算。

c.说明正被测量RF的同种型是什么。

**D. 程序限制**

建议纳入与程序有关的限制说明，包括以下内容：

1. 阴性结果并不排除类风湿性关节炎。诊断为类风湿性关节炎的患者中约25％可能出现阴性RF结果。24
2. 某些非类风湿病、结缔组织疾病和各种其他疾病状态（如肝炎）可引起阳性RF试验。24
3. RF存在于三种主要的免疫球蛋白类别中：IgA、IgG和IgM。大多数用于RF的试验系统设计用于检测IgM RF，因为该分子较大并且更易于与涂覆于试验系统的固相载体上的人IgG反应。因此，这些试验将仅检测IgM类的RF。
4. 使用EIA或ELISA系统产生的可复现结果需要进行仔细移液、严格遵守培育期和温度要求，以及彻底清洗试验孔和彻底混合所有溶液。
5. 溶血、黄疸或脂血样本可能干扰比浊法、测浊法、EIA或ELISA。说明用户应该如何处理具有这些特性的样本。

**E. 预期值**

1. 正常人群中的预期值为负数。然而，明显健康、无症状的个体中可能存在RF。这些个体通常具有较低的滴度。假阳性的发生率随年龄增加而增加，且在女性和男性中相似。
2. 应该说明其中通过测定检测到RF类风湿性关节炎的患者频率（百分比）。
3. 阳性试验的临床意义必须通过评估患者的总临床图像来确定。

**参考文件**

1. Waaler， E. On the occurrence of a factor in human serum activating the specific agglutination of sheep blood corpuscles. ActaPathol. Microbiol. Scan. 1940；17：172-178.
2. Rose HM， Ragan C， Pearce E， and Lipmann MO. Differential agglutination of normal and sensitized sheep erythrocytes by sera of patients with rheumatoid arthritis. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1948；68：1-11.
3. Cathcart ES. Rheumatoid Factors in Laboratory Diagnostic Procedures in the Rheumatic Diseases. 2nd ed. Cohen AS (ed.). Boston， MA： Little， Brown， & Co.， 1975；104.
4. Freyberg RH. Differential Diagnosis of Arthritis. Postgrad. Med. 1972；51(20)：22-27.
5. Lawrence JS， Locke GB and Ball J. Rheumatoid Serum Factor in Populations in the U.K.I.Lung Disease and Rheumatoid Serum Factor. Clin. Exp. Immunol. 1971；8：723.
6. Linker JB III， and Williams RC Jr， Tests for detection of rheumatoid factors， In： Rose NR， Friedman H， and Fahey JL， Eds. In： *Man. Clin. Lab. Immunol，* 3rd Ed. Wash，DC： ASM；1986：759-761.
7. Jonsson T and Valdimarsson H. Is measurement of rheumatoid factor isotypes clinically useful? Annals of the Rheumatic Diseases. 1993；52(2)：161-4.
8. Jonsson T and Valdimarsson. Clinical significance of rheumatoid factor isotypes in seropositive arthritis. Rheumatology Intl. 1992；12(3)：111-3.
9. van Zeben D， Hazes JMW， Zwinderman AH， Cats A， van der Voort EAM and Breedveld FC. Clinical significance of rheumatoid factors in early rheumatoid arthritis： results of a follow up study. Annals of the Rheumatic Diseases. 1992；51(9)：1029-35.
10. Teitsson I， Withrington RH， Seifert MH and Valdimarsson H. Prospective study of early rheumatoid arthritis. I. Prognostic value of IgA rheumatoid factor. Annals of the rheumatic diseases. 1984；43：673-678.
11. Silvestris F， Goodwin JS and Williams RC Jr. IgM， IgA and IgG rheumatoid factors in patients with rheumatoid arthritis and normal donors. Clinical rheumatology. 1985；4：392-398.
12. Allen C， Elson CJ， Scott DGI， Bacon PA and Bucknall RC. IgG antiglobulins in rheumatoid arthritis and other arthritides： relationship with clinical features and other parameters. Annals of the Rheumatic Diseases. 1981；40：127-131.
13. Pope R M， McDuffy S J. IgG rheumatoid factor. Relationship to seropositive rheumatoid arthritis and absence in seronegative disorders. Arthritis Rheum. 1979；22：988-98.
14. Singer JM and Plotz CM. The Latex Test， I. Application to the Serological Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. Am. J. Med. 1956；21：888.
15. Waller M， Toone EC and Vaughn C. Study of Rheumatoid Factor in the Normal Population. Arthritis Rheum. 1964；7：518-520.
16. Vadlamudi SK， Stewart WD， Fugate KJ， Tsakeris TM Performance characteristics for an immunoassay. Scand J Clin Lab Invest 1991；51：134-138.
17. Peters T， Westgard JO. Evaluation of methods， Chapter 7. In： Tiets NW， editor. In： Fundamentals of Clinical Chemistry， 3rd ed. Philadelphia， PA： WB Saunders Co；1987：225-37.
18. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of the linearity of quantitative methods； proposed guideline，1986. Order code EP6-P.
19. Information for authors. Clin Chem. 1991；37：1-3.
20. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices - 2nd ed； tentative guideline， 1991：1-56. Order code EP5-T2.
21. National Committee for Clinical Laboratory Standards. User comparison of quantitative clinical laboratory methods using patient samples； proposed guideline， 1985；6(1). Order code EP9-P.
22. Ash KO. Reference Intervals (Normal Ranges)： A Challenge to Laboratories. Am. J. Med. Tech. 1980； 46：504-11.
23. National Committee for Clinical Laboratory Standards. How to define， determine， and utilize reference intervals in the clinical laboratory； proposed guideline. Villanova， PA 1991. Order code C28-P.
24. Shimmerling RH， Delbanco TL. The Rheumatic Factor： An Analysis of Clinical Utility. The American Journal of Medicine， 1991；91：530.

