

数コピーから数十コピーのウイルスゲノム検出が可能とされ、このような微量のウイルス検出においては定量的取り扱いがきわめて困難である。ウイルススクリーニングにおいては、どの程度の確実性でウイルスゲノムが検出できるのかが最も重要なファクターといえる。一方、医薬品の製造工程におけるウイルスクリアランスの評価やウイルス検出試験に用いる試料の抽出、精製、保存等の効率を評価する場合にはウイルスを定量的に検出する必要がある。ウイルスクリアランスの評価はモデルウイルスを使用することが可能であるが、特定のウイルス検出のための、試料の抽出、精製、保存等の評価においては目的とするウイルスを実際に使用することが求められる場合もある。しかし、HCV や HBV 等では感染力によりこのようなウイルスクリアランスを評価することが困難であり、定量的な NAT が有効である。ガイドラインでは、ウイルス検出法として NAT は基本的に定性的なものとしてとらえられるが、定量的に用いる際に考慮すべき必要事項についても言及されるべきである。

1. 適応の範囲

ガイドラインで扱うウイルス NAT としては、ドナースクリーニング試験、原料血漿の製造工程への受け入れ試験、さらには必要に応じて行われる血漿分画製剤や血液製剤の製造過程における工程管

理試験や最終製品試験を対象としている。

ウイルス NAT 試験法は主として目的ウイルスゲノムの存在の有無を調べる定性試験と考えられるが、国際あるいは国内標準品からの自社標準品の作製などの定量試験として用いる場合もある。血漿プールのウイルススクリーニング試験としての NAT は、定性試験として行われる。従って、ウイルスゲノム検出を目的として NAT を採用する場合に、その分析法バリデーションの重要な項目は特異性と検出限界の2点である。分析法バリデーションを行う場合には、分析法の頑健性についても評価することが必要である。ウイルス NAT における、特異性、検出限界、分析法の頑健性は以下のように定義される。

NAT における特異性とは、試料中に共存すると考えられる物質の存在下で、目的とする核酸を確実に検出する能力と定義される。

検出限界とは、試料中に含まれる目的ウイルス遺伝子の検出可能な最低の量で、定量できるとは限らない量と定義される。

分析法の頑健性とは、分析条件を小さい範囲で故意に変化させるときに、測定値が影響されにくい能力と定義され、通常の試験における信頼性の指標になる。

2. 特異性

NAT の特異性は、プライマーの選択、プローブの選択(最終産物の検出に関する)、試験条件の厳密さ(増幅及び検出工程の両方)に依存している。プライマーとプローブをデザインした際には、用いるプライマーとプローブが目的ウイルスゲノムのみを検出できるとする根拠を示す必要がある。類似ウイルスへの交叉反応性の可能性についても特に注意する必要がある。この場合、公開されているデータバンクにより、選んだ全ての配列をデータ検索する方法が有効である。さらに、解析に用いたソフト、解析条件についても説明する必要がある。多くの場合、通常プライマー(およびプローブ)を設計する際には、遺伝的に非常によく保存されているウイルスゲノムの領域が用いられる。増幅した産物は、Nested Primer による増幅、制限酵素による解析、シーケンスあるいは特異的なプローブによるハイブリダイゼーションのいずれかの方法によって確実に同定するべきである。

検出しようとする配列がどの程度保存されているものであるか、GC含量の程度、さらには配列の長さなどについて科学的合理性について説明する必要がある。一種類以上のサブタイプあるいは複数種のウイルスを検出しようとする場合にはその妥当性も含めて説明をするべきである。プライマーやプローブの選択の

合理性についても説明するべきである。定量的なアッセイを行う場合には、そのデザインと定量のための標準品の性質について説明することが必要であろう。

分析法の特異性をバリデートするために少なくとも 100 個の目的ウイルス陰性血漿あるいは陰性血漿ミニプールを試験し、陰性であることを示すことが望ましい。

NAT 検査により目的とするウイルスの種々の遺伝子型を検出できる能力はプライマー、プローブ、反応条件に依存する。これは適切な reference panel を使用することによって証明することが必要である。

3. 試験の最適化

ウイルスの検出に NAT を確立していく場合には、ウイルスゲノムの抽出、目的配列の増幅、検出、定量、及びこれらを行うための機器の設定と試験に関する最適化した規格を定めておく必要がある。NAT に用いる以下の情報について明らかにしておくべきである。

3-1. 目的とするウイルスゲノムの増幅しようとする領域、長さ、特異性、

3-2. プライマーとプローブに関して

プライマーとプローブは核酸検出系の中心的役割を果たしており、その品質が NAT の重要な要素となっている。プライマーやプローブについて次のような情報を明らかにしておくことが必要

である。

(1) 選択したプライマーとプローブの科学的合理性を説明すること。

(2) 検出しようとするウイルスゲノムの最も共通する配列の選択等、どのように複数のサブストレインを検出できるようにしているのかを説明すること。

(3) プライマーの大きさ、GC含量、 T_m 値、想定されるヘアピン構造や2次構造についての情報を明らかにしておくこと。

さらに、採用しようとしている NAT ができる限り多くの目的ウイルスのサブタイプ、バリエーションを検出できるようにデザインされている必要がある。

用いる合成プライマーやプローブの品質に関して以下のような情報を明らかにしておくべきである。

(4) 複数のロットの合成プライマーやプローブの特性解析結果やイールド等についての詳細なデータを示すことが望まれる。

(5) プライマーやプローブの化学修飾を行う場合には、その詳細についてデータを含めて説明するべきである。

(6) プライマーやプローブの純度について最新の測定法を用いて解析し、解析結果を示すとともに、必要に応じてその規格値を定めておくことが必要である。

(7) プライマーやプローブの力価

について、段階的希釈法での検出能を指標とするなどして解析するとともにロット間の一定性についてのデータを示すことが必要である。

3-3. 反応に用いる緩衝液について

NAT の増幅反応、ハイブリダイゼーション、検出に用いる反応液の試薬の品質や純度について解析する必要がある。また、その試薬や反応液の安定性等について解析しておくとともに有効期限を定めておくことが必要である。これらの試薬や反応液の受け入れ規格を適正な評価に基づいて作成すべきである。

3-4. 酵素

NAT に用いるすべての酵素は由来と機能を明らかにしておくこと。酵素の純度、力価、比活性について受け入れ規格を定めておくこと。

調製した酵素について、エクソヌクレアーゼ活性、DNA 及び RNA 依存性のポリメラーゼ活性等を明らかにしておくことが必要である。

以上の試薬について市販のものを用いる場合には、メーカーによる解析結果を入手し保存しておくことが必要である。

4. 標準検体(標準品、参照品、ランコ

ントロール)

NAT においては、各試験の精度や感度のコントロールには標準品あるいは参照品が必須である。通常 NAT 試験法の開発過程における、ウイルス濃縮、ゲノムの抽出、増幅、ハイブリダイゼーション、定量、汚染をモニターするために標準品、参照品、ランコントロールを用いた解析を行う必要がある。

検出限界の設定やランコントロールにおいては、95%の確率で検出される検出限界をモニターできる量の標準検体と、その3倍量のウイルスを含む標準検体(あるいは定量性のある下限量の標準検体)を用いることが推奨される。試験では、この3倍量の標準検体をスパイクした標準検体は必ず陽性にならなければならない。このような2種類の標準検体を用いることにより、各試験の成立をモニターすることが望ましい。

また、複数のサブタイプのウイルスパネルに対して上記のような2種類の標準検体を作製して試験を行い、各サブタイプに対してどれほどの検出能があるか評価しておくべきである。ウイルスパネルの選択にあたってはウイルス流行についての地理的な疫学データ等を参考するべきである。

5. 検出限界

NAT による血漿あるいは血漿ミニプー

ルのウイルス否定試験は通常定性試験である。結果は陰性か陽性のいずれかである。NAT 検査では95%の確率で検出される検体一定量あたりの標的分子の最低量である陽性カットオフ値を検出限界値として設定する。陽性カットオフ値は、検体中のウイルスゲノムの分布や酵素の効率のような因子により影響され、個々のウイルス NAT 検査でそれぞれの95%カットオフ値が存在する。

陽性検出限界を測定する際は、国際標準品あるいは今後策定されていくであろう国内標準品を用いるか、国際標準品あるいは国内標準品に対して校正された参照品や自社標準品の希釈系列を用い、別々の日に試験を実施すること。少なくとも3つの独立した希釈系列を用い、十分な回数試験を繰り返し、各希釈段階での総試験回数が24になるように試験を実施する。例えば、3つの希釈系列を別々の日に8回行う、4つの希釈系列を別々の日に6回行う、6つの希釈系列を別々の日に4回行うなどである。希釈液の数を処理しやすい数にするために、予備試験(例えば指数段階的に希釈を作製するなど)を行い予備的な陽性検出限界値(すなわち陽性シグナルが得られる高い希釈倍率)を決定する。希釈範囲は、予備的な陽性検出限界値付近を選択する(希釈液として陰性血漿を用い、希釈率として0.5logまたはそれ以下を使用する)。あるいはバリデートされた定量

的 NAT を用いることも可能である。95% の確率で検出されるウイルスゲノム量は適切な統計学的手法によって算出すること。また、これらの結果は試験法の日内変動と日差変動を示す役目も果たすことになる。

6. 分析法の性能確認

もし二人以上の者が試験を実施する場合、試験者ごとに少なくとも 8 本の、95% の確率で検出される標準ウイルス検体量の3倍量をスパイクした目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料について試験を実施すべきである。この試験(8 本の試験検体)を別々の日に3回繰り返すこと(すなわちのべ3日の試験により計 24 試験が実施されることになる)。その結果が全て陽性になること。また同様に、重要な装置(例えば自動抽出機やサーマルサイクラーなど)を何台か使用する場合も、95% の確率で検出される標準ウイルス検体量の3倍量をスパイクした目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料 8 本を試験し、結果が全て陽性になることを確認すべきである。

7. 頑健性

NAT 試験法を確立する過程で頑健性を評価すべきである。分析条件を小さい範囲で変化させても測定値が影響さ

れないという信頼性を示すことが必要である。NAT の場合、分析条件の小さな変動が重要になる。しかし NAT の頑健性は、塩化マグネシウム、プライマー、dNTP のような試薬の濃度を小さい範囲で変動させて試験することにより、方法を確立していく過程で示すことができる。頑健性を示すためには、少なくとも 20 個の目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料(ランダムに選択する)と95% の確率で検出される標準ウイルス検体量の3倍量をスパイクした目的ウイルス陰性血漿プールあるいは試験を行うのと同様の組成の陰性試料を用いて試験を実施し、すべての陰性血漿プールが陰性を示し、全ての陽性試料が陽性を認めることによって示すことができる。ウイルスゲノムの抽出前に超遠心を使用する方法などでは頑健性に関して特に注意を払う必要がある。この場合、可能であれば目的ウイルスに対する特異的抗体を持たないが目的ウイルスゲノム陽性である複数の血漿を使用して試験することにより示すことができる。クロスコンタミネーションが防止できていることを示すために、陰性血漿プールと高い濃度の目的ウイルスをスパイクした陰性血漿プール(濃度としては95% の確率で検出されるウイルス量の 100 倍量以上)の少なくとも 20 検体をランダムに配置し、試験することが望ましい。

8. 判定

陽性及び陰性の判定基準を明確にし、文書化しておくこと。再試験を行うときの基準、再試験での判定基準についても文書化しておくべきである。

9. 輸送・保管

検体の保管、輸送条件の妥当性について、それを裏付けるデータを示して明らかにすることが必要である。保管、輸送等において定められた条件を逸脱していないかモニターするとともに、モニター結果を記録に残すことが必要である。

10. 施設・設備

ウイルス NAT 試験は、数コピーから数十コピーのウイルスゲノムを検出できるため、増幅産物による汚染等に細心の注意を払う必要がある。このため、NAT 検査に用いる施設について、増幅前の試料を取り扱う部屋と増幅産物を取り扱う部屋とを区別することが望まれる。この場合に、それぞれの施設は独立した空調等を備えていることが望まれる。また、可能な限り試験検体のミニプール化等の前処理、核酸抽出、試薬調製を独立した施設ないしは設備を用いて行うことが望ましい。さらに、増幅産物を取り出して試験を行う必要がある場合には、独立した施設ないしは設備にて行うことが必要である。

11. 品質管理

NAT 検査においては、数コピーから数十コピーのウイルスゲノム検出が可能とされ高感度であるために操作中の汚染やピペット操作や試験チューブの開閉等を含め従事者の技能がその試験の成否を大きく左右する。NAT 検査の恒常性を担保するには検査従事者の教育と技能向上が非常に重要である。NAT 検査従事者に対して教育・訓練をおこなうとともに必要に応じて定期的にその技能検査を行うことが推奨される。

ピペット、サーマルサイクラーの校正等、機器操作による変動に関しても評価することが必要である。この評価に加え、分析法全体の有効性と信頼性を評価すべきである(システム適合性試験)。市販のキットを試験法の一部または全てに使用する場合で、キットの製造元で実施されたバリデーション資料がある場合はユーザーによるバリデーションデータに加えることができる。しかし、その目的に応じたキットの性能を示す必要がある。NAT のような生物学的試験は、分析法のバリデーションや試験結果そのものが種々の要因の影響を受け易いので、試験操作法は標準操作手順書などに正確に記述することが必要である。標準操作手順書には以下の項目を入れるべきである。

- ・サンプリングの方法(容器の種類等)
- ・ミニプールの調製(適切な段階)

- ・試験までの保存条件
- ・クロスコンタミネーションやウイルスゲノム・試薬・標準検体の分解を防止するための試験条件の正確な記述
- ・使用する装置の正確な記述
- ・統計解析を含む結果の詳細な計算式

D. 結論

血液製剤のウイルス NAT ガイドライン策定にあたって考慮すべき事項や要素について、関連する種々の文献に加えて EU や米国のガイドラインを参考に調査研究を行った。その結果、ウイルス NAT の精度や特異性、検出感度をどのように評価すべきかについての基本的考え方を明らかにすることができた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Matsui, S., Adachi, R., Kusui, K., Yamaguchi, T., Kasahara, T., Hayakawa, T., and Suzuki, K.: U73122 inhibits the dephosphorylation and translocation of cofilin in activated macrophage-like U937 cells. *Cell. Signalling*, 13, 17-22, 2001
- 2) S.Matsui, S.Matsumoto, R.Adachi, K. Kusui, A.Hirayama, H.Watanabe, K.Ohashi, K.Mizuno, T.Yamaguchi, T.Kasahara, K.Suzuki: LIM Kinase 1 Modulates Opsonized

Zymosan-triggered Activation of Macrophage-like U937 Cells. POSSIBLE INVOLVEMENT OF PHOSPHORYLATION OF COFILIN AND REORGANIZATION OF ACTIN CYTOSKELETON. *J. Biol. Chem.*, 277, 544-549 (2002)

- 2) 豊田淑江、山口照英、内田恵理子、押澤正、早川堯夫、好中球機能分化と増殖の制御、炎症・再生、21(3)、199-207、2001
- 3) 早川堯夫、真弓忠範、黒澤 努、豊島 聰、山口照英、川西 徹:トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討 医薬品研究 (印刷中)
- 4) 早川堯夫、豊島 聰、山口照英、川西 徹:トランスジェニック動物由来医薬品の品質・安全性確保に関する基礎的検討:国立医薬品食品衛生研究所報告第 119 号、2001
- 5) 早川堯夫、谷本 剛、山口照英、川西 徹、酒井喜代志:医薬品各条の改正点—生物薬品、薬局、52、77-83、2001
- 6) 早川堯夫、山口照英、石井(渡部)明子:平成 12 年度「日本薬局方の試験法に関する研究」— 核酸増幅法によるウイルスゲノム等検出に関するフイージビリティスタディ. 医薬品研究 印刷中
- 7) 早川 堯夫、山口 照英、押澤 正:

日局生物薬品の品質・安全性確保に関する研究 ― ウイルス安全性確保の基本要件 ―、医薬品研究印刷中

2. 学会発表

1) 山口照英、早川堯夫：バイオテクノロジーを応用した医薬品の品質及び安全

性確保の評価科学. PDA 第9回年会及び併催シンポジウム、東京、平成13年1月5-6日

2) 山口照英：細胞・組織利用医薬品・医療用具の品質管理手法について. 第6回関西バイオコンファレンス、神戸、平成14年3月12日

Guidance for Industry

In the Manufacture and Clinical Evaluation of *In Vitro* Tests to Detect Nucleic Acid Sequences of Human Immunodeficiency Viruses Types 1 and 2

Additional copies are available from:
Office of Communication, Training and
Manufacturers Assistance (HFM-40)
1401 Rockville Pike, Rockville, MD 20852-1448
(Tel) 1-800-835-4709 or 301-827-1800

(Internet) <http://www.fda.gov/cber/guidelines.htm>

U. S. Department of Health and Human Services
Food and Drug Administration
Center for Biologics Evaluation and Research (CBER)
December 1999

TABLE OF CONTENTS

Note: Page numbering may vary for documents distributed electronically.

I. INTRODUCTION	1
II. INTENDED USE	3
III. MANUFACTURING	3
A. Rationale and Design.....	3
B. Assay Optimization.....	4
C. Sample Preparation.....	5
D. Primers and Probes.....	5
E. Reaction Buffers.....	6
F. Enzymes.....	7
G. Controls and Calibrators.....	7
H. Other Test Kit Components.....	9
I. Detection and Quantitation of Amplicons.....	9
J. Instrumentation and Software.....	9
K. Sterility/Bioburden.....	10
L. Kit and Component Stability.....	10
IV. CLINICAL VALIDATION OF ASSAY PERFORMANCE	10
A. Preclinical Studies.....	10
B. Clinical Trials: General Issues.....	12
C. Specificity and Sensitivity Studies for Test Kits with a Proposed Labeling for Screening of Blood and Plasma Donors.....	14
D. Studies to Validate Intended Use as Additional, More Specific Tests.....	17
E. Clinical Prognosis and Management of Patients on Therapy.....	18
F. Perinatal Diagnosis.....	21
V. CONCLUSIONS	21
VI. REFERENCES	22

GUIDANCE FOR INDUSTRY¹

In the Manufacture and Clinical Evaluation of *In Vitro* Tests to Detect Nucleic Acid Sequences of Human Immunodeficiency Viruses Types 1 and 2

I. INTRODUCTION

In March 1985, the U.S. Food and Drug Administration (FDA) licensed the first screening test for the detection of antibodies to Human Immunodeficiency Virus (HIV) in serum and plasma from infected individuals. As of October 1999, there were 27 licensed kits and 5 premarket approvals (PMAs) for detection of antibodies to HIV-1 or HIV-2 in blood, saliva, or urine, which included: 19 Enzyme-Linked Immunosorbent Assays (ELISAs), 3 Western Blots, 1 Particle Agglutination Assay, and 1 Indirect Immunofluorescence Assay (IFA) for detection of antibodies to HIV-1, as well as 3 ELISAs for detection of HIV-1 p24 antigen, 2 of which are for use in donor screening. The ELISAs include 4 combination tests for detection of antibodies to HIV-1 and HIV-2 in blood specimens.

FDA recently licensed the first test for the detection of HIV-1 antibodies in urine specimens. HIV ELISAs have been approved to screen blood and plasma donors. The IFA, the Rapid Latex Agglutination Assay, and the colorimetric Single Use Diagnostic System (SUDS), may be used to screen blood donors in urgent situations. They are primarily used for urgent testing in hospitals, laboratories, medical clinics, physician's offices, emergency care situations, blood banks, or other health care settings when a routine ELISA is unavailable or impractical. Repeatedly reactive results from screening assays are further evaluated by additional, more specific tests which include Western Blot and IFA. In December 1994, FDA approved the first oral fluid collection device for professional use with a licensed HIV-1 antibody test kit and in June 1996, a supplemental Western Blot test to further evaluate the presence of antibodies in oral fluid was approved. Two PMAs for home blood sample collection kits, labeled as part of a HIV testing system, were also approved by FDA in 1996 (one has been voluntarily discontinued by the manufacturer). The first PMA for a HIV-1 nucleic acid test, a quantitative HIV-1 ribonucleic acid (RNA) test based on amplification of deoxyribonucleic acid (DNA)

¹ This guidance document represents the agency's current thinking on *in vitro* testing to detect specific nucleic acid sequences of HIV. It does not create or confer any rights for or on any person and does not operate to bind FDA or the public. An alternative approach may be used if such approach satisfies the requirements of the applicable statute, regulations, or both.

sequences using the polymerase chain reaction, to measure viral load in plasma as an aid in determining patient prognosis, was approved by FDA in June 1996.

In recent years, several technical advances have been made in methodologies for direct detection of viral nucleic acid. This document provides guidance on manufacturing and clinical trial design issues pertaining to the validation of tests based on nucleic acid detection either in the presence or absence of an amplification step. Concerns regarding the procedures used for detection of amplified products are also addressed. As may be the case with new technologies, issues may be identified during the review process, unique to the particular methodology under review or the specific configuration of the assay that will need to be addressed on a case-by-case basis. It is also recognized that this area of science is in a state of rapid technological development. As advances are made, this document will be reevaluated and revisions or modifications made as necessary. The criteria outlined below address both general and specific concerns for nucleic acid based detection techniques for HIV. This document is intended for products regulated by the Center for Biologics Evaluation and Research (CBER). The FDA uses mandatory language, such as shall, must, and require, when referring to statutory or regulatory requirements. The FDA uses non-mandatory language, such as should, may, can and recommend when referring to guidance.

The reader is referred to the Points to Consider in the Manufacture and Clinical Evaluation of *In Vitro* Tests to Detect Antibodies to the Human Immunodeficiency Virus Type 1 (1989) (Ref. 1) for general information on filing of the Investigational New Drug Applications (INDs), Product License Applications (PLAs), Establishment License Applications (ELAs), and content of applications for approval and licensure of retroviral kits. General regulations related to these products are located in 21 CFR parts 312, 600-680, and 800. Other documents that may be pertinent to this topic include the "Review Criteria" document (Ref. 2) issued by the Center for Devices and Radiological Health (CDRH), and the Guidance for Industry: Content and Format of Chemistry, Manufacturing and Controls Information and Establishment Description Information for a Biological *In Vitro* Diagnostic Product (Ref. 3) issued by CBER.

As set forth in the Intercenter Agreement of 1991 between CBER and CDRH, *in vitro* tests for HIV, that are recommended for blood donor screening and related blood bank practices, are licensed under the Public Health Service Act (PHS Act) through the IND/PLA/ELA/Biologics License Application (BLA) mechanism. *In vitro* tests for HIV, that are not performed in relation to blood bank practices (e.g., quantitative HIV assays and diagnostic tests that evaluate specimens other than blood), will be regulated by CBER under the Medical Device Authorities through the Investigational Device Exemption (IDE)/Premarket Approval Application (PMA) mechanism. *In vitro* diagnostics for pathogens other than HIV are regulated by CDRH under the IDE/PMA mechanism.

The scientific and regulatory concerns pertaining to validation of *in vitro* diagnostic/screening test kits can be broadly classified into three main categories: 1) intended use; 2) manufacturing; and 3) clinical validation of assay performance.

II. INTENDED USE

The sponsor should state clearly in the application (IND, PLA/ELA, BLA, or IDE/PMA) the intended use, the labeling claims, and the clinical utility for the product. The proposed clinical trial design should be capable of demonstrating assay performance at a level that is sufficient to validate the intended use claim in the target patient population and the specific test setting. It is recommended that the sponsors/manufacturers meet with CBER to obtain guidance early in the development process in order to resolve any issues with regard to an approvable claim for the product or special concerns related to the product, and to address any questions the manufacturers may have. This should include a discussion of the proposed claim for clinical utility and the clinical studies that will be performed to validate the proposed claim, including equivalence or superiority to existing methods or licensed tests, if available, for detection and/or quantitation of the same agent.

III. MANUFACTURING

The manufacturing issues that may have an impact on product design and performance are: 1) rationale of assay design; 2) assay optimization; 3) sample collection, extraction, storage and stability; 4) manufacture of primers, probes, reagent buffers, enzymes, calibrators, controls, and quantitation standards; 5) anchoring components, i.e., beads, plates, chips; 6) kit stability; and 7) instrumentation and software. This document addresses concerns pertaining to each of the points outlined above.

A. Rationale and Design

The sponsor should provide in the application, the rationale for the specific indication and for use of the specific test methodology, and type of nucleic acid target (DNA or RNA) for detection of the infectious agent and for the specific indication. A detailed description of all aspects of the technique including sample preparation, assay optimization, amplification, and detection methods should be provided. Validated quality control procedures that are state-of-the-art should be used to assure manufacturing consistency. The sponsor should provide details of assay optimization and establish the format of the final product during the preclinical stage of development. Changes in assay format may lead to a recommendation for new studies. The rationale for assay design should address the following aspects:

1. Selection of target sequence(s) in the template including the degree of nucleic acid sequence conservation, guanine:cytosine (GC) ratio, and length. For products intended to detect more than one virus subtype or species (e.g., a “multiplex” design) define the number of target nucleic acid sequences and the rationale for their selection;
2. Assay format (e.g., sample type, conjugate, detector);
3. Selection of primer and probe sequences (e.g., degree of nucleic acid sequence conservation); and
4. Design and nature of the quantitation standards for a quantitative assay.

B. Assay Optimization

This phase is critical to product development and can have a significant impact on product performance. The sponsor should address the various aspects of optimization for nucleic acid extraction, target sequence, amplification, detection, quantitation, and instrumentation for these processes, and set specifications for performance. The application should contain information on the details of:

1. The length, region, specificity, and efficiency of primer and/or capture sequence;
2. Methods of extraction, amplification, hybridization, detection, and quantitation;
3. Percent recovery of nucleic acid for the total assay and for each significant step in the process of sample preparation;
4. Optimization of reaction conditions and kinetics of amplification with multiple primers or hybridization with multiple probes or both (e.g., for a multiplex format);
5. Internal and external assay calibrators/controls; and
6. Procedures to prevent cross-contamination.

During this phase of assay optimization, the sponsor should determine and define the optimal assay conditions, reaction kinetics and the lower bounds of reliable assay performance. For qualitative assays the assay cutoff, or reporting threshold, is the lowest concentration of HIV RNA copies per ml that the assay can reliably distinguish from HIV negative samples ($\geq 95\%$ detection rate). For quantitative assays, the lower limit of reliable assay performance may be defined by two potentially distinct values; the lower limit of detection (LOD) and the lower limit of quantitation (LOQ). For the purpose of this document the LOD is defined as the lowest concentration of analyte that can be distinguished from a negative specimen with a predefined level of assay sensitivity. The LOQ is the lowest concentration of analyte that is distinguishable from a negative specimen with the same degree of sensitivity as the LOD that is also quantifiable with an acceptable degree of precision and accuracy (e.g., CV of $\leq 35\%$).

The assay cutoff/reporting threshold or LOD should be well defined in terms of copy numbers and the unit of sampling. This limit should be validated by an established form of independent characterization (e.g., an (approved) amplification technique or a combination of more direct measurements such as particle counts, EM scanning and quantitation of RNA by optical density). The assay cut-off or LOD can be established by in-house testing then further defined or verified based on the data from clinical trials. If the assay is quantitative, additional studies should be conducted to examine:

7. Linearity in the readable range in order to ensure accurate interpolation of unknown specimens. This range should also be clinically meaningful to demonstrate the clinical utility of quantitation; and
8. Accuracy and reproducibility based on quantitation of analytical specimens on a standard curve (analytical sensitivity). These studies should also provide a preliminary estimate of the LOQ.

C. Sample Preparation

The sponsor should specify the type of specimen (e.g., cells, plasma, whole blood, dried blood spots) and the template for amplification (DNA and RNA) and hybridization, as appropriate. The composition of the buffers, reagents, and detergent or chaotropic agents used for nucleic acid extraction should be clearly specified. The effect of anticoagulants and any potential inhibitors present in the sample or extraction buffers on assay performance should be evaluated.

Controls that monitor the efficiency of the extraction and reverse transcription (when the template is RNA) procedures should be included and whenever possible, these controls should simulate the actual sample type. Spiked controls are also acceptable.

The reproducibility of the sample preparation method should be determined under the specimen processing conditions including sample handling, storage, and shipping conditions. The sponsor should also verify possible interference of specimen processing reagents with reverse transcription, amplification, hybridization, detection, and quantitation. For pool testing, sample stability during pooling and the subsequent processing steps should be determined.

D. Primers and Probes

The primers and probes are the main components of a nucleic acid based detection system and the performance of the assay is highly dependent on the quality of these reagents. The sponsor should provide the:

1. Rationale for selection of primers and probes including specific sequences used;

2. Justifications for alignments made to generate consensus sequences or best-fit modifications made to existent sequences, e.g., to permit maximum homology to several strains; and
3. Information on size, GC content, melting temperatures, hairpin or other secondary structures if any, and the nucleotide position on the genome map of the primers and probes.

For assays designed to detect or quantitate multiple HIV subtypes or variants, data should be provided to demonstrate that the primers and/or probes chosen are effective for all of the subtypes or variants identified in the label.

If synthetic oligonucleotides are used as primers and probes, details of the manufacture and purification should be provided. In addition, the following information should also be included:

4. The yield and composition for the first 3 lots (at a minimum) by absorbance and DNA fingerprinting, restriction endonuclease mapping or nucleotide sequence analysis;
5. A description of the chemical nature of the modification, for modified oligonucleotides and procedure(s) to insure lot to lot consistency of ligand content;
6. Nucleotide sequence analysis to establish the fidelity of the procedure for oligonucleotide synthesis;
7. The purity of the final product should be analyzed by an appropriate state-of-the art analytical technique (e.g., reverse phase high performance liquid chromatography, electrophoresis or ion exchange HPLC), that has been validated according to ICH guidelines;
8. Potency of primers and probes. This may be addressed by dilutional analysis comparing lot-to-lot consistency in functional efficiency or other methodology appropriate to the technology under development.

The analyses listed in 6-8 should be conducted on each lot of oligonucleotide manufactured as a routine part of new product development and characterization. If a high degree of consistency is demonstrated over time the sponsor may request a reduction in the frequency of required monitoring.

E. Reaction Buffers

The sponsor should demonstrate the identity and purity of reagents used in the preparation of reaction buffers that are employed in amplification, hybridization, and detection reactions. The potency and stability of the reagents on storage and under cycling conditions should be verified.

If reagents are obtained from vendors, the quality system regulations (21 CFR 820.50 and 820.80) require the manufacturer to establish and maintain procedures to ensure that all received reagents conform to specified requirements. The extent of control necessary will be related to the nature of the reagent, taking into account the effect of the reagent on the finished product. A certificate of analysis should be provided for purposes of verification and the criteria used for acceptance/rejection of specific reagents defined. If deviations from component specifications could result in the product being unsuitable for use, a sponsor may be expected to sample and test components.

F. Enzymes

The source and function of all enzymes used in the assay should be identified and clearly defined. The identity, purity, potency, and specific activity should be demonstrated and criteria for acceptance established.

For rDNA-derived enzymes manufactured by the sponsor, the master and working cell banks should be characterized for cell and genetic stability, and freedom from adventitious agents. Plasmid stability should be monitored by assays that include restriction mapping or DNA sequencing. If restriction mapping is used for plasmid monitoring confirmation of enzyme amino acid composition and sequence by peptide mapping and amino acid sequencing should also be considered.

Enzyme preparations should be tested for other enzymatic activities, e.g., exonucleases and DNA and RNA dependent polymerase activities and specifications should be established. For enzymes obtained from vendors, the certificate of analysis should be provided. In addition, functional testing designed to assure that the component is suitable for its intended use, should be performed as part of establishing the acceptance criteria.

G. Controls and Calibrators

Controls are important tools that allow the operator to verify that the assay has performed within accepted specifications and are, therefore, a vital component of any test kit. Controls should be separate from, and in addition to, reagents used to estimate the concentration of an unknown sample (i.e., standards or calibration reagents).

In nucleic acid analysis, there are several steps in the testing process, as outlined above, that should be monitored and verified. It is therefore advisable to include multiple controls or controls that serve multiple purposes in the final kit. The controls should reflect the specific

technology under development but will typically allow for monitoring of ultracentrifugation, extraction, amplification, hybridization, quantitation, contamination, etc. These controls should be similar to the specimen type whenever feasible although spiked controls may be acceptable, particularly for labile analytes.

Sponsors are strongly encouraged to include a minimum of two positive controls to monitor assay performance. A control at or near the LOD or assay cutoff/reporting threshold should be incorporated into any assay that will be read in a qualitative fashion. For the validation of individual assay runs with a diagnostic assay, it is recommended that this control be within three standard deviations of the assay cut-off/reporting threshold.

For quantitative assays the low concentration positive HIV RNA control for validation of individual runs should be within 3 standard deviations of the LOQ. The second positive RNA control may fall anywhere within the linear range of the assay. In the event that the assay LOD is different from the lower limit of quantitation sponsors are strongly encouraged to include an additional control at the LOD to allow laboratories to monitor, on a routine basis, their ability to detect RNA at that level.

Assays that have or are seeking a label claim for quantitation of multiple viral subtypes should make a subtype specific positive RNA control available for each subtype.

Multiple negative controls should be included such as non-target sequences and nucleic acid free controls to monitor for false positives resulting from contamination. Due to the high sensitivity of amplification assays, it is highly recommended that sponsors include control measures for prevention of contamination events.

Specifications for both positive and negative controls should be provided, as well as validation data supporting the proposed assay cut-off/reporting threshold value or LOD of the assay. The sponsor should define the source of the controls and calibrators, and have a plan for their continued renewal. Controls should be non-infectious, and validation of viral inactivation should be provided.

For quantitative assays, validation data should be provided for all quantitation standards and calibrators. Specifications and acceptance criteria should be established for each control/calibrator and for the collective set of controls. Quantitation should be based on co-amplification of a heterologous internal control and/or a competitive RNA template or co-hybridization, as indicated by the technology under development. For RNA assays, the efficiency of reverse transcription should be determined for the specific assay format.

H. Other Test Kit Components

The sponsor should provide a description of the anchoring solid phase component (e.g., plates, beads, filters), concentration of antigen or oligonucleotide on the component method of conjugation, or binding to the component, and a demonstration of lot-to-lot consistency of manufacture of bound component.

If more than one component is used for coating (e.g., two oligonucleotides) a description of the validation of coating methods including ratios used and acceptance criteria for the coating process should be provided. If the sponsor purchases a solid phase component (e.g., beads, plates, chips) a description of the source, quality assurance methods, and acceptance criteria should be included.

I. Detection and Quantitation of Amplicons

A detailed description of the chemical/biochemical nature of capture probes, conjugates, detectors, quantitation standards, etc., which are part of the assay system should be provided. This should include:

1. The chemistry and limits of detection of system of choice (e.g., chemiluminescence, fluorescence);
2. Chemical and biochemical characterization of the ligand, chromophore, fluorochrome, including stability under reaction conditions;
3. Quality control and assurance of conjugation to detect or capture oligo- or polynucleotide sequence, including functional testing; and
4. Nature and copy numbers of the quantitation controls and standards.

Validation data should be provided for controls and quantitation standards. Specifications should be established for the individual and/or collective set of controls/quantitation standards used to detect/quantitate nucleic acid.

J. Instrumentation and Software

Any dedicated equipment used in the amplification, detection, and quantitation of the amplified product should be validated for its use. These may include devices such as thermal cyclers, waterbaths, luminometers and cycling ovens.

Validation of thermal cyclers should include demonstration of the accuracy of temperatures of individual wells during the cycling process, specify limits for well-to-well variation, if any, as well

as any impact there may be on test results. If software is utilized for amplification, detection, and calculation of quantitative or qualitative results, validation of such software for the intended function should be provided.

For non-dedicated instruments, the premarket notification (510k) submission number should be cited for review. If previously approved under a PMA, a supplement for use with the product under review should be submitted.

If special specimen collection, storage and/or transport devices are used, specifications should be provided for conditions of collection, storage, and transport. Criteria should be established for suitability and adequacy of the specimen for the test.

K. Sterility/Bioburden

Refer to the "Points to Consider in the Manufacture and Clinical Evaluation of In Vitro Tests to Detect Antibodies to Human Immunodeficiency Virus Type 1" (1989) for guidance in this area.

L. Kit and Component Stability

The stability of the final kit and individual components should be tested using a panel of specimens, including weak reactives (e.g., near cut-off, middle, and upper end of the readable range). A reference panel consisting of plasma spiked with known amounts of virus is acceptable for this study. The real time stability at storage and shipping temperatures should be evaluated using specimens with varied reactivities in the readable range.

IV. CLINICAL VALIDATION OF ASSAY PERFORMANCE

A. Preclinical Studies

Preclinical studies, performed either in-house or at field sites, provide preliminary information on assay performance. These studies should be designed to assess the sensitivity, specificity, and reproducibility of the test kit, as well as to identify the lower bounds of reliable assay performance (i.e., the assay cut-off/reporting threshold, LOD and LOQ, as appropriate for the assay under development). In general, preclinical testing should be performed prior to initiation of clinical validation studies, particularly if prospective, large scale clinical trials are planned. Clinical validation of these preliminary assessments is then accomplished through field testing of