**II类特殊控制指导性文件：用于检测肠病毒RNA的核酸扩增测定**

文件发布日期：2009年1月2日

有关本文件的问题，请拨打电话301-796-5456或电子邮件发送至uwe.scherf@fda.hhs.gov联系Uwe Scherf博士。

|  |  |
| --- | --- |
| CDRH Logo | **美国卫生与公众服务部**  **食品药品监督管理局**  **器械与放射健康中心**  **体外诊断器械评估和安全办公室**  **微生物学器械部** |

***包含非约束性建议***

**前言**

**公共评论**

贵公司可以随时提交书面评论和建议至食品药品监督管理局，文档管理部（5630 Fishers Lane，rm。1061，（HFA-305），Rockville，MD，20852），供部门审议。另外，电子评论请提交至[http：//www.regulations.gov](http://www.regulations.gov)。请使用提供指南的联邦公报通告中列出的文件编号标识所有评论。可能直到文件下次修订或更新时，评论才会被机构受理。

**其他副本**

其他副本可从互联网获得。贵公司也可以发送电子邮件请求至dsmica@fda.hhs.gov以接收本指南的电子副本，或发送传真请求至301-847-8149获得硬拷贝。请使用文档编号（1665）来标识贵公司所要求获得的指南。

**目录**

1.引言  
2. 背景  
3. 范围  
4. 健康风险

5.器械描述  
6. 性能  
7. 标签  
8.参考文件

**行业和FDA工作人员指南**

**II类特殊控制指导性文件：用于检测肠病毒RNA的核酸扩增测定**

**1. 引言**

食品药品监督管理局（FDA）已将本指南作为特殊控制指南而编制，支持将肠病毒核酸测定分类为II类（特殊控制）。肠病毒核酸测定旨在用于人脑脊液（CSF）中肠病毒RNA的扩增和定性检测。肠病毒RNA的检测与其他实验室试验（如细菌革兰氏染色、细菌培养、CSF葡萄糖、CSF-血糖比、CSF蛋白浓度和CSF白细胞计数）或其它肠病毒实验室检测方法结合时，可有助于临床实验室诊断患有脑膜炎或脑膜脑炎的临床体征和症状的患者是否具有肠病毒感染。该测定包括引物、探针、酶（逆转录酶和DNA聚合酶）和特异性肠病毒内部和外部控制。这些测定中有一些仅设计用于特定的工具系统。

用于定性检测肠病毒RNA的肠病毒核酸测定通常可用于检测肠病毒。此类测定的申办方应该证明该测定可以检测与无菌性脑膜炎（例如肠病毒、柯萨奇病毒、艾柯病毒和脊髓灰质炎病毒）相关的所有血清型（目前有64种血清型）。该测定的结果为阳性时并不排除脑膜炎可源于其它原因，包括细菌、分枝杆菌、其他病毒（例如疱疹家族病毒、虫媒病毒、腮腺炎病毒）和真菌。

本指南与联邦公报通告一起公布以宣布肠病毒核酸测定的分类。将本文件指定为特殊控制意味着任何为肠病毒核酸测定提交510（k）的公司都需要解决本指南中涉及的问题。此类公司必须证明，其器械已通过满足本指南的建议或通过提供等同性的安全性和有效性保证的其他方法，解决本指南中确定的安全性和有效性问题。

本指导性文件确定肠病毒核酸测定的分类法规和产品代码（第3节 - 范围）。本指南文件的其他部分列出了FDA确定的健康风险，并说明措施，如果制造商遵循此文件并与总体控制措施相结合使用，可通常解决与这些测定相关的风险并可使上市前通告审查和批准及时进行。

**最小负担方法**

本指导性文件中确定的问题代表我们认为在贵公司器械可上市之前需要解决的问题。在制定本指南时，我们仔细考虑相关法定标准以便于本审查机构做出决定。我们还考虑贵公司尝试遵守本指南并解决我们确定的问题时可能产生的负担。我们认为，我们已采用最小负担方法来解决本指导性文件中提出的问题。但是，如果贵公司认为有负担更小的方式可以用于解决这些问题，则贵公司应遵循文件“解决最小负担问题的建议方法”中概述的程序。

**2.背景**

FDA认为，当与一般控制组合使用时，特殊控制将足以对用于在脑脊液样本中定性检测肠病毒RNA的肠病毒核酸测定的安全性和有效性提供合理保证。拟上市此类器械的制造商应（1）遵守联邦食品，药品和化妆品法案（法案）的一般控制，包括21 CFR 807子部分E（2）中所述的上市前通告要求，处理肠病毒核酸测定的特定健康风险，以及（3）在上市该器械之前从FDA获得实质等同性确定。

本文件补充其他与上市前通告提交的具体内容要求有关的FDA文件。贵公司还应参考21 CFR 807.87和有关此主题的其他FDA文件，例如：上市前通告：510（k），其可在以下网站获得：。提交给FDA的上市前通告510（k）有三种类型：传统、特殊和简化。特殊和简化510（k）方法的编制用于帮助简化510（k）审查程序，并在“**新版510（k）范式 – 用于在上市前通告中证明实质等同性的替代方法；最终指南**”对其进行说明。有关简化和传统510（k）的内容和格式的指南可以在“传统和简化510（k）的格式”中找到。有关使用标准的信息可以在该法案第514（c）（1）（B）节（21 USC 360d（c）（1）（B））以及FDA指南“实质等同性判定的使用标准”中找到。考虑对其自己已批准的器械进行修改的制造商可以选择提交特殊510（k）。有关如何编制特殊510（k）的信息可在“如何编制特殊510（k）”中找到。

**3.范围**

本文件的范围仅限于21 CFR 866.3225（产品代码OAI）中所述的以下器械：

**21 CFR 866.3225** –肠病毒核酸测定。

1. 肠病毒核酸测定是一种由引物、探针、酶和控制组成的器械，其用于具有与脑膜炎或脑膜脑炎一致的体征和症状的个体的脑脊液（CSF）中的肠病毒RNA扩增和检测。肠病毒RNA的检测与其它实验室试验相结合时可有助于对由肠病毒引起的病毒性脑膜炎进行临床实验室诊断。

（b）分类。II类（特殊控制）。特殊控制是FDA的指导性文件，其标题为“II类特殊控制指导性文件：用于检测肠病毒RNA的核酸扩增测定”。本指导性文件的可用性见§866.1（e）。

本特殊控制指南就用于减少以下部分（第4节 - 健康风险）中确定的风险的具体信息提供建议。

本指南不涉及用于测试无症状个体的器械（即筛选）。不同类型的研究设计将适用于包括筛选的预期用途。

本指南也不完全处理除CSF以外的模型试验。在这些情况下，须进行更多研究。

FDA已经制定与通常建议纳入用于核酸扩增试验的试剂的510（k）中的信息类型有关的指南草案。我们建议制造商在最终定稿时也参考该指南[参考文件：1]。

**4.健康风险**

脑膜炎或脑膜脑炎可以由细菌、病毒引起，且在其他情况下也可由真菌和原生动物引起，但此类情况在美国较不常见。细菌性脑膜炎是一种更为严重并可潜在危及生命的脑膜炎，而病毒性脑膜炎通常由肠病毒或疱疹病毒引起，其通常可在7-10天内自我消退[参考文件：2]。约90％的病毒性脑膜炎病例由肠病毒引起[参考文件：2，3]，并且一些作者认为肠病毒是美国脑膜炎的最常见原因，他们估计，每年因此产生的住院治疗有30，000至50，000次 [参考文件：4]。在分类学上，肠病毒的类别属于那些由脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、艾克病毒和肠病毒组成的病毒[参考文件：5，6]。

目前，对于临床怀疑有脑膜炎或脑膜脑炎的患者，在细菌和疱疹病毒病毒性培养结果可用（2 -3天），并排除细菌感染之前，应进行脊髓穿刺以确定疾病的病因，并且用抗生素和可能的抗病毒药物对患者进行预防性治疗[参考文件：7]。一种用于检测脑脊液样本中肠病毒RNA的快速肠病毒核酸扩增测定与其它CSF实验室测试（如细菌革兰氏染色、细菌培养、CSF葡萄糖、CSF血糖比、CSF蛋白浓度、CSF白细胞计数）或用于肠病毒检测的其他实验室方法时可以帮助医生快速鉴定患者是否患有由肠病毒引起的病毒性脑膜炎，从而防止抗生素的不必要使用以及重复进行脊髓穿刺的可能性。与其他诊断试验一样，肠病毒试验结果应基于其他临床发现和实验室试验解释。如果试验结果与临床和传统实验室结果不一致，应根据脑膜炎的现行实践对患者进行管理。

如果用于检测肠病毒RNA的核酸测定未能按预期执行或未能正确解释结果，则可能导致做出不正确的患者管理决定：

* 假阴性报告可能导致延误提供（甚至无法提供）最终诊断，以及对患者使用抗生素进行不必要的治疗。假阳性报告可能导致细菌性脑膜炎或其他形式的脑膜炎的治疗延迟。这种由于肠病毒的假阳性结果而引起的治疗延迟可以使潜在的危及生命的细菌性脑膜炎加重，随后使患者的病态加重，甚至可能导致患者死亡。
* 如果器械发生故障，则可无法生成结果（例如，由于试剂、工具、数据管理或软件发生故障）或如果结果无效或不确定，则可能延迟诊断，并可能需要额外收集CSF液体，而该程序又具有一定的感染风险。

此外，肠病毒的新血清型的出现可能影响用于检测CSF样本中肠病毒RNA的肠病毒核酸扩增测定的性能。选择用于检测肠病毒的引物和探针，因为其与存在于大多数肠病毒血清型中的病毒RNA节段内的高度保守区域具有同源性。引物和探针可能无法检测到随时间推移而出现的新血清型。此外，试验性能可能受到影响，因为由新的肠病毒血清型引起的疾病的流行病学和病理学可能改变。

FDA已经确定通常与使用核酸扩增测定检测肠病毒RNA相关的健康风险。本指导性文件中提供建议用于缓解这些已确定风险的措施，如下表所示。

我们建议贵公司在提交上市前通告之前进行风险分析，以确定器械特有的其他任何风险。上市前通告应对风险分析方法进行说明。如果贵公司选择使用替代方法来解决本文件中确定的特定风险，或者识别出本文件所未确定的风险，贵公司应提供足够的详细信息以支持贵公司用于解决该风险的方法。

|  |  |
| --- | --- |
| **已确定风险** | **建议缓解措施** |
| 试验未能正常执行  •肠病毒的假阳性检测  •假阴性结果  •结果延迟以及采集新的患者样本的要求   * •无法检测具有新的肠病毒血清型的病毒RNA | 第5-6节 |
| 未能正确解释试验结果 | 第7节 |

**5.器械描述**

在贵公司的510（k）提交资料中，贵公司应该确定法规、产品代码和合法销售的比较器械。为了帮助FDA有效地审查贵公司器械与比较器械相比的所有方面，我们建议贵公司纳入表格，概述比较器械与贵公司器械之间的异同。

新器械审查中的关键问题是具体的预期用途、所测试的样本类型、核酸分离的方法以及用于扩增和信号检测的技术。除了描述性信息之外，贵公司还可以提交适当的同行审查文献参考资料（但其须与器械技术相关），对新器械进行充分说明。

贵公司应该纳入以下描述性信息，充分表征贵公司用于检测肠病毒RNA的核酸扩增测定：

**A.预期用途**

贵公司的510（k）必须包括对贵公司产品的预期用途进行说明的标签。（请参见21 CFR 807.87（e）。）预期用途应包括待测试的患者人群、试验适用的样本类型（例如CSF）和任何特定的使用条件。贵公司应确保所有预期用途的成分已得到明确说明，特别是有关适用于使用该器械进行检测的肠病毒血清型（例如肠病毒、埃克病毒、柯萨奇病毒、脊髓灰质炎病毒）。

在贵公司的510（k）中，贵公司应清楚说明与产品预期用途相关的以下信息：

* 贵公司器械设计用于检测的肠病毒血清型的特性、系统发育关系或其他公认的特征。
* 器械试验结果如何用于诊断算法，以及在疑似无菌性脑膜炎中实验室鉴定肠病毒RNA所需的其他措施。
* 与患者病例诊断相关的临床和流行病学参数（例如，细菌革兰染色、细菌培养、CSF葡萄糖、CSF-血糖比、CSF蛋白浓度和CSF白细胞计数）。[参考文件：5-8]。

注：可使用用于最终确定肠病毒的实验室方法。可能需要使用多种样本类型以用于诊断真相测定，请参见CLSI M41-A表3，CSF，粪便，呼吸拭子和液体[参考文件：8]。

**B.试剂和其他器械组件**

当在贵公司的510（k）中对试剂和其他器械组件进行说明时，我们建议贵公司遵循其他FDA指导性文件中提供的一般指南。FDA已经制定有关核酸扩增试验的指南草案，其在最终定稿时将与此主题尤其相关[参考文件：1]。此外，贵公司应说明贵公司器械的设计要求，以处理或缓解与用于检测肠病毒的病毒RNA片段并基于核酸的试验程序中使用的引物、探针、工具和控制相关的风险。（510（k）中的性能数据应该支持“设计要求以满足”的结论）。示例包括：

* 设计贵公司的用于闭管试验系统（例如自含式灌流器）的试剂，尽量减少由扩增产物或遗留物污染引起的假阳性。
* 制定提取和纯化方法，其可从CSF中产生合适质量和数量的病毒RNA，以与贵公司的试剂一起用于试验系统中。
* 优化贵公司的试剂和推荐工具的试验程序。

我们建议贵公司纳入任何非标准器械或方法的插图或照片（如果适用）。

贵公司应该提供适当的文献，以支持可检测任何肠病毒血清型基因组中的保守RNA片段这一结论。

***辅助试剂***

辅助试剂是制造商在器械标签中指定为“需要但未提供”的试剂，以便进行如其使用说明中所指示的测定，并达到测定标记中所要求的试验性能。就本文件而言，相关辅助试剂是必须根据制造商和目录或产品编号或其他特定名称指定的辅助试剂，以使贵公司器械达到其标记的性能特性。例如，如果贵公司器械标签规定使用Brand X DNA扩增酶，则使用任何其他DNA扩增酶可能会使贵公司的标签中报告的器械的性能特性有所变化，那么就本文件而言，Brand X DNA扩增酶则为一种辅助试剂。[1](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm092757.htm#ft1)

相比之下，如果贵公司器械需要使用95％乙醇，任何含有95％的乙醇品牌将允许贵公司器械达到贵公司的标签提供的性能特性，，那么就本文件而言， 95％乙醇并非一种相关的辅助试剂。

如果贵公司器械的使用说明指定一个或多个相关辅助试剂，贵公司应该说明贵公司如何确保使用贵公司器械和这些辅助试剂并根据贵公司的说明进行的试验的结果将与贵公司的上市前提交中所确定的性能一致。贵公司的计划可能包括应用质量体系方法、产品标签和其他措施。

为解决本特殊控制的这一方面，贵公司的510（k）提交应涉及下述成分。FDA将评估贵公司的计划是否有助于缓解器械所带来的风险，以为器械的安全性和有效性提供合理保证，并确定其实质等同性。

* 贵公司应在贵公司的510（k）中纳入针对辅助试剂的使用而进行的风险评定，其中应包括与试剂质量和变异性管理相关的风险、与辅助试剂直接提供的使用说明和贵公司用贵公司的测定提供的使用说明之间不一致相关的风险，以及可能带来使贵公司的测定结果不正确的风险的任何其他问题。
* 使用贵公司的风险评定作为适用性的基础，贵公司应该在贵公司的510（k）中说明贵公司如何通过对辅助试剂实施任何必要的控制来降低风险。这些可能包括（如果适用）：
  + 用户标签，以确保辅助试剂的使用适当。
  + 评估用户是否遵守辅助试剂标签说明的计划。
* 辅助试剂的材料质量标准。
* 鉴定试剂批次，以确保贵公司器械的性能适当。
* 稳定性试验。
* 投诉处理。
* 纠正和预防措施。
* 在辅助试剂出现可影响测定性能的问题时对用户进行警告的计划。
* 为了确保安全有效地使用贵公司的试验以及指定的辅助试剂，应根据贵公司器械的使用说明解决的任何其他问题。

此外，贵公司应提供试验数据，确定贵公司提供或推荐的质量控制足以检测辅助试剂的性能或稳定性问题。

如果贵公司对辅助试剂的鉴定、使用或控制有疑问，请联系FDA以获得建议。

**C.使用贵公司器械的试验程序**

在贵公司的510（k）中，贵公司应该详细说明贵公司器械的操作原理，包括检测和区分核酸与肠病毒的原理。贵公司应该具体说明试验条件、程序和控制，其旨在防止可能导致假阳性和假阴性结果的情况。这些包括但不限于：

* 试验程序的整体设计，包括纳入推荐试验程序的控制成分。控制材料应近似临床相关病毒RNA水平的较低范围，并且应作为临床样本提取。
* 任何内部控制（例如，监测污染、提取效率和扩增抑制的内部控制）的说明或建议。
* 用于监测对扩增和检测产生不利影响的程序错误或因素的功能和附加控制（例如，主混合物的降解）。

我们建议贵公司对贵公司的使用说明中纳入用以缓解与肠病毒试验相关的风险的所有其他程序、方法和操作说明（见第7章 - 标签）。

**D.解释试验结果/报告**

在贵公司的510（k）中，贵公司应该说明如何确定阳性、阴性、不定（如适用）或无效结果以及如何对其进行解释。此外，贵公司应该说明如何在时间推移中监控结果来确定由于病毒血清型分类中的生物变化而导致的性能变化，或者当患病率从评估产品时的现有患病率变化时的性能变化。

**6.性能**

**A.一般研究建议**

在贵公司的510（k）中，贵公司应就贵公司进行的、用以确定下述每个性能特性的研究提供详细的描述性信息。一般来说，对于用于确定精确性的分析研究和临床研究，我们建议贵公司在3个站点进行试验，其中，这些站点应代表贵公司打算销售该器械的站点（例如，临床实验室站点）。

对于贵公司推荐用于贵公司测定的每种样本类型，贵公司应该对贵公司测定的性能进行评估。

为了在审查期间准确地解释验收标准或数据摘要，我们建议贵公司提供与方案有关的适当的具体信息。此信息对于帮助用户理解标签中的信息也很重要。例如，当提及CLSI（临床和实验室标准研究所）方案或指南时，我们建议贵公司说明贵公司遵循了方案或指南的哪些具体方面。

我们建议贵公司联系体外诊断器械评估和安全办公室（OIVD）的微生物学器械部以获得有关贵公司预期研究和贵公司打算支持的临床声明的反馈。申办方可联系OIVD来获取有关研究计划的反馈。

**B. 对照**

在进行下述性能研究时，我们建议贵公司在分析和临床研究期间每天进行适当的外部对照。适当外部对照的示例包括疫苗或原型疫苗菌株、低致病性病毒和灭活病毒。贵公司可以联系FDA的OIVD微生物学器械部以获取有关对照的进一步信息。对于基于核酸技术的器械，我们通常建议贵公司进行以下类型的对照：

***阴性对照***

*空白或无模板对照*

空白或“无模板”对照包含缓冲液或样本转运培养基和除核酸以外的所有测定组分。此类对照用于排除靶核酸的污染或扩增反应中的强化背景。但对于在单次试验一次性灌流器或导管中进行的测定，可能无需阴性对照。

*阴性样本对照*

阴性样本对照包含非靶核酸，或者如果用于对提取程序进行评估，其包含整个微生物。其可揭示非特异性引发或检测，并可指示在缺乏靶序列的情况下无法获得信号。可接受的阴性样本对照材料的示例包括：

* 来自非肠病毒感染个体的患者样本
* 含有非靶微生物的样本（例如，受非肠病毒感染的细胞系）
* 替代阴性对照，例如外来壳体化RNA [参考文件：9]

***阳性对照***

*用于完全测定阳性对照*

阳性对照包含靶核酸，并用于对照整个测定过程，包括RNA提取、扩增和检测。其设计用于模拟患者样本，并作为单独测定与患者样本同时运行，其中，运行频率由实验室质量体系（QS）确定。可接受的阳性测定对照材料的示例包括：

* 受肠病毒毒株感染的细胞系
* 包裹肠病毒RNA

*用于扩增/检测的阳性对照*

用于扩增/检测的阳性对照包含处于或接近用于定性测定的检测限的纯化靶核酸。当获得阴性结果时，其对照患者样本和反应组分的完整性。如果靶标存在于样本中，其可指示靶标已被检测到。

***内部对照***

内部对照是与靶核酸共同提取和共同扩增的非靶核酸序列。其对照试剂（聚合酶、引物等）的完整性、设备功能（热循环仪）和样本中抑制剂的存在。可接受的内部对照材料的示例包括与肠病毒共同提取的人类核酸和扩增人类管家基因（例如，RNaseP、β-肌动蛋白）的引物。是否需要这种对照取决于器械的类型[参考文件：10]。

**C.性能研究**

我们建议贵公司贵公司的在510（k）中为贵公司的肠病毒（EV）测定确定以下性能特性：

**1.分析灵敏性**

*检测限*

我们建议贵公司使用再生长和再滴定的病毒原液（其已被有限稀释）确定五种EV种类CVA6（A）、CVA9（B）、，CVA17（C）、EV70（D）和PV1（脊髓灰质炎病毒）中每一种的检测限（LoD）。该研究应包括对5种血清型中每一种的代表进行的系列稀释，以及在汇总EV阴性人类样本或等效模型中进行的每种稀释重复3-5次。贵公司应根据可提供95％检测率的病毒水平对LoD进行报告。LoD应该通过在LoD浓度下至少再重复操作20次并证明病毒的检测率可达95％来证明。LoD测定的推荐参考方法是组织培养感染剂量50（TCID 50）和噬菌斑测定。由于基于核酸的器械不仅可检测感染性病毒颗粒，而且可检测存在于试验样本中的总病毒RNA，所以还可以纳入量化核酸（例如基因组拷贝等同物或病毒RNA的μg/ mL）的其他参考方法。

我们建议贵公司确定器械所测试的最常用或最具技术挑战性的模型中每种分析物的LoD。设计贵公司的研究时，我们建议贵公司参考CLSI文件EP17-A [参考文件：11]。

*分析反应性（包含性）*

我们建议贵公司证明试验可以检测贵公司的引物和探针设计用于检测的所有EV血清型。应在汇合型EV阴性人类样本或等效模型中进行稀释。应该确认所有病毒的特性和滴度。

**2.分析特异性**

*交叉反应性*

我们建议贵公司测试与其他相关微生物（包括细菌，病毒和寄生虫）的潜在交叉反应性。特别是，贵公司应该在完整微生物存在的情况下表征该试验的性能，其中，此类微生物应可带来类似临床症状的，并且可能与EV感染（例如EBV、HSV-1、HSV-2、HHV-6、HHV-7、腺病毒-2、麻疹、腮腺炎、副流感1-4、流感A、流感B、VZV、CMV、B组链球菌、流感嗜血杆菌B、流感嗜血杆菌非B、大肠杆菌、脑膜炎奈瑟菌、弗氏柠檬酸杆菌和柠檬酸柠檬酸杆菌）混淆。此外，应评估高浓度的完整白细胞以及从白细胞分离的总RNA的交叉反应性。我们建议贵公司测试病毒和细菌的医学相关水平（通常对于细菌为10 6 cfu / ml或更高，而对于病毒为10 5 pfu / ml或更高）。我们建议贵公司确认病毒和细菌的特性和滴度。

*干扰*

我们建议贵公司使用医学相关浓度的干扰物进行全面干扰研究，评估可在指定人体样本中出现的物质的潜在抑制作用。

潜在的干扰物质包括但不限于以下：可以共同感染患者的其他病毒或细菌试剂、所选择样本的其他成分（例如白细胞、蛋白质、全血、血红蛋白）和对照或加入样本以用于对照的试剂。我们建议贵公司在所用EV血清型确定的测定临界值对干扰进行测试。我们还建议贵公司评估每种处于潜在最高浓度（“最坏情况”）的干扰物质。如果没有观察到显著的临床效果，则无需进行进一步试验。有关其他信息，我们建议贵公司参考CLSI文件“临床化学中的干扰试验”，EP7-A2 [参考文件：12]。

**3. 精确性**

*实验室内精确性/重现性*

我们建议贵公司对包括工具或自动化组件的器械进行实验室内精确性研究。贵公司可以在内部执行这些研究，即在贵公司自己的公司内。

我们建议贵公司对变异性来源（如操作员，天数，测定运行）进行测试，共计至少12天（不一定连续），其中，须有2名操作员，每名操作员每天执行2次运行，每次运行对每个样本重复测试2次。如果校准周期短于2个月，这些试验天数应至少跨越两个校准周期。我们建议试验组由3-6例样本（1-2例病毒毒株）组成（其中，其病毒载量应有三个水平），具体包括：

* “高阴性”样本（C5浓度）：分析物浓度低于临床临界值的样本，使得对该样本进行的重复试验结果中约有95％呈阴性（即阳性结果约为5％）。
* “低阳性”样本（C95浓度）：分析物浓度刚好高于临床临界值的样本，使得对该样本进行的重复试验结果中约有95％呈阳性。
* “中等阳性”样本：具有预期可使阳性结果约为100％（例如，临床临界浓度的约2-3倍）的浓度的样本。

将空白限（LoB）用作临界值时，则浓度C 95与检测限（LoD）相同，并且并且如果LoB确定具有5％的I类误差，则零浓度（样本中不存在分析物）为C5。2有关详细信息，请参见EP17-A [参考文件：11]。CLSI文件EP5-A2 [参考文件：13]和EP12-A [参考文件：14]包含有关设计和执行精确性研究的更多信息。

*重现性*

作为一般指南，尽管具体详情可能因测定方式而异，我们仍然建议使用以下方案来评估重现性。

* 在3个试验站点（例如，至少两个外部站点和一个内部站点）对贵公司试验的重现性进行评估。
* 使用长达五天的试验方案，其中，每天至少运行两次（除非测定设计未涵盖每天运行多次），以及每次运行时对每个小组成员重复测试三次。
* 每天，至少使两名操作者在每个设施处进行试验。我们建议，对于快速试验或护理点（POC）3器械，贵公司应使贵公司的评估涵盖更多器械，以最好地代表将使用器械的环境。
* 使用与上述重现性研究中所述相同的样本组。
* CLSI文件，EP15-A2 [参考文件：15]，含有关于重现性研究设计的更多信息。

**4.遗留/交叉污染研究（用于需要使用仪器的多样本测定和器械）**

我们建议贵公司证明贵公司器械不会发生遗留和交叉污染（包括核酸提取方法）。在遗留研究中，高阳性样本应以依赖于器械的操作功能的模式与高阴性样本交替使用。在遗留研究期间，贵公司应至少对高阳性和高阴性样本进行5次交替操作。遗留研究中的高阳性样本比例应该足够高，以超过从预期使用人群的患病患者样本获得的结果的95％或以上。高阴性样本应含有低于临界值的分析物浓度，使得对该样本进行的重复试验中约有95％给出阴性结果。然后可以通过遗留研究中高阴性样本的阴性结果与95％相比的百分比来估计遗留作用。有关详细信息，请参见[参考文件：16]。

**5.样本采集、处理、存储和运输条件**

如果贵公司针对样本采集、运输和存储条件提出意见，贵公司应该证明使用以与器械包装说明书中推荐的方式相同的方式处理的样本时贵公司器械可产生类似结果。对于样本存储条件，贵公司应该证明对于在推荐存储期间的几个时间点和推荐温度范围的两端存储的样本贵公司器械可产生类似结果。如果推荐将病毒转运培养基（VTM）用于存储或运输，贵公司应该进行适当的研究，证明在样本保存在VTM中时该器械的性能将与所述性能一致。[参考文件：7]。

**6.核酸提取方法**

贵公司应该进行分析和临床研究，证明贵公司推荐的用于CSF或其他样本类型的核酸提取程序的有效性和重现性。这些分析研究应包括使用已知的感染性病毒浓度（例如，噬斑形成单位（pfu）或50％组织培养感染剂量（TCID 50））测定每个所声明的样本类型检测限（LoD）以及针对每个所声明的样本类型进行的研究的重现性。在“检测限”（请参见检测限，上文第6.c.1节）中提供了与进行LoD研究有关的建议。核酸提取的重现性评估应在三个站点（例如，两个外部站点和一个内部站点）、在临床临界点附近的病毒浓度下并在标签中指定的模型中进行。我们建议贵公司使用五天试验方案，使用长达五天的试验方案，其中，每天至少运行两次（除非测定设计未涵盖每天运行多次），以及每次运行时对每个小组成员重复测试三次。试验组应包括3-6例样本（含有1至2例临床上显著的血清型[毒株、类型或血清型（如果适用）]），其中，样本应处于三个不同的病毒载量水平。有关重现性研究的建议，请参见上文第6.c.3节。

如果贵公司选择获得与多种提取方法有关的许可，贵公司应该证明每种方法的LoD和重现性。假设提取方法可对整个分析性能引入最小变异性，贵公司可以考虑将提取方法变量与每个站点性能变量组合。例如，如果贵公司推荐使用三种不同的提取方法，贵公司可以通过对每个试验站点的三种提取方法之一进行评估来设计重现性研究：站点1处的试验提取方法A，站点2处的方法B以及站点3处的方法C。如果从上述试验组产生的结果没有显示显著差异，则无需进一步进行重现性研究。然而，如果三个站点的初始提取等同性研究表明测定性能在统计上具有显著差异，则应该扩大重现性研究来纳入在三个研究站点对每种提取方法进行的试验（例如，站点1提取方法A，站点2提取方法A 以及站点3提取方法A）。

除分析研究（LoD和重现性）之外，在临床试验期间应当在至少一个临床中心中使用每种提取方法（工具）来产生临床性能数据。如果扩大的重现性试验的结果表明提取方法之间的有效性有显著差异，则来自每个临床试验站点（使用不同的NA提取方法）的数据被视为不具等同性，因此不应该进行汇总，而是单独分析。因此，可能需要额外的前瞻性临床样本，以便针对每种所说明的提取方法获得在统计上数量显著的预期样本。

将空白限（LoB）用作临界值时，则浓度C 95与检测限（LoD）相同，并且如果LoB确定具有5％的I类误差，则零浓度（样本中不存在分析物）为C5。有关详细信息，请参见EP17-A [参考文件：11]）。CLSI文件EP5-A2 [参考文件：13]和EP12-A [参考文件：14]含有有关设计和执行精确性研究的更多信息。

**7.患病率（预期值）**

贵公司应该确定某一地方性人群中EV的患病率，其中，其体征和症状与脑膜炎或脑膜脑炎一致。贵公司应该对在统计上数量相关并代表预期用途的样本进行分析，包括指定的样本模型。贵公司应该根据贵公司的新器械性能提供这些结果，并根据年龄组（婴儿<1岁，儿童1-5，6-10，11-15，16-21岁，成人> 21岁））和性别总结人群分布。由于该器械不用于筛选血液或组织供体，所以来自这些供体的样本不应用于本研究。

**8.临床研究**

贵公司应该进行前瞻性临床研究，确定贵公司在标签中针对所有样本类型为贵公司器械声明的性能。贵公司应该前瞻性地从具有与临床怀疑脑膜炎或脑膜脑炎一致的体征和症状的个体采集样本。贵公司应该说明每个临床研究的方案（包括纳入和排除标准、研究端点、验收标准），并说明研究如何支持拟定预期用途。贵公司应该纳入足够数量的样本，以使结果在统计和临床上具有意义。存档样本可用于提供来自患有脑膜炎症状并且新鲜样本可能不易获得的患者（例如，来自非常年轻的患者的CSF）的样本。使用存档样本时，应使用选择方案以最小化偏差，并应选择适当的档案室。此外，应遮掩样本以避免试验偏差。如果对新鲜和存档冷冻样本均进行了测试，我们建议贵公司对数据进行单独分析。对于存档样本，结果应表示为百分比一致性。

我们建议贵公司评估并将贵公司器械的性能与使用复合参考方法的预定算法进行对比。此外，贵公司器械也应该与EV病毒培养物进行对比。复合参考方法应包括实验室结果，如：

1.可提供与脑膜炎一致的临床证据的方法，例如， CSF革兰氏染色、CSF细菌培养、CSF葡萄糖、CSF-血糖比、CSF总蛋白浓度、CSF白细胞计数等实验室结果。来自其他样本类型的结果，例如粪便样本也可以是复合参考方法的一部分。

2.通过两种不同的良好表征且经验证的核酸扩增试验（NAAT）在CSF中检测EV基因组。NAAT引物对应可产生扩增子，其中，其来自不同基因组区域。NAAT测定中应有一个可提供序列信息。双向测序应在扩增子的两条链上进行，并且所产生的序列应具有可接受的质量（通过PHRED或类似软件包测量的质量评分为40或更高），并应与参考或共有序列匹配。[参考文件：10，17]。

贵公司可以联系OIVD中的微生物学器械部，了解有关建立使用复合参考方法的预定算法的更多信息。

*研究方案*

我们建议贵公司制定详细的研究方案，方案需包括患者纳入和排除标准及所需样本的类型和数量、使用说明以及解决差异以防止数据产生偏差的统计分析计划。我们建议贵公司在贵公司的510（k）中纳入此和任何其他相关方案信息。

我们鼓励申办方联系微生物器械部，要求对贵公司拟定的研究和样本类型选择进行审查。此过程被称为预IDE过程。我们特别鼓励制造商在样本难以获得或申办方计划首次提交上市前通告时寻求进行此类讨论。

*样本类型*

贵公司在贵公司的研究中应纳入以用于证实可检测EV的声明的样本总数将取决于病毒的患病率和测定性能。

对于用于检测EV RNA的器械，我们建议贵公司为每个贵公司声明的样本类型纳入足够数量的前瞻性采集的样本，以使结果中，灵敏性为90％，双侧下限为95％且CI大于80 ％。应当证明所有EV RNA检测器械具有特异性，其中，双侧下限为95％且CI大于90％。

如果贵公司对适用样本类型的选择和数量有疑问，请联系微生物学器械部。

*研究站点*

我们建议贵公司至少在三个不同的地理位置进行研究，代表在临床实践中将使用该试验的个体最终将使用该器械（例如，临床实验室）的试验环境。至少有一个研究站点应位于美国内部。其中一个研究站点可为内部站点。

针对未批准和未审批的体外诊断器械进行的临床研究受制于联邦食品，药品和化妆品法案（21 U.S.C. 360j）第520（g）节的器械临床研究豁免（IDE）规定和实施法规。贵公司应该考虑21 CFR第812部分（IDEs）如何适用于贵公司的特定研究，并参考第50部分（知情同意）和第56部分（机构审查委员会审查）以了解其他适用要求。根据21 CFR第812部分，对具有重大风险的器械进行的临床研究需要向FDA提交IDE申请进行审查和批准。贵公司还可以参考“有关IRB、临床研究者和申办方以及具有重大风险和非重大风险的医疗器械研究的信息表指南”，“使用不能单独识别的残留人体样本进行体外诊断器械研究的知情同意指南”，其网址为：[http：//www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1588.pdf](http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1588.pdf)以及“体外诊断（IVD）器械研究 - 常见问题”，其网址为：http：//www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/1587.pdf。

*研究人群*

我们建议贵公司对具有脑膜炎或脑膜脑炎症状和体征的个体进行研究。我们建议贵公司从每个年龄组纳入在数量上具有一定意义的样本。除总体数据摘要表外，我们建议贵公司提供按年龄分层的数据（例如新生儿，2个月至21岁，22岁及以上的成人）。

*结果呈现*

在贵公司的510（k）中，贵公司应该说明如何选择样本以及排除样本的任何原因。

我们建议贵公司首先分析和呈现来自每个研究站点的数据，评估任何站点间的变化，并将分析结果纳入在510（k）中。如果贵公司可以证明在站点之间，结果或人群方面在统计或临床上没有显著差异，则可以在包装说明书中汇总来自各个站点的临床研究结果。

我们还建议贵公司为针对“临床诊断真相”（通过使用复合参考方法的预定算法确定）评估的前瞻性临床样本进行分析并单独呈现数据； 存储针对“临床诊断真相”评估的前瞻性采集的临床样本；以及针对病毒培养物评估的前瞻性临床样本；并存储针对病毒培养物评估的前瞻性采集的临床样本。

我们建议贵公司在所有临床研究中提供列式数据，其中应包括每日适当提供外部对照试验数据。贵公司可以使用Microsoft EXCEL、分隔文本文件或SAS文件以电子方式提供此信息。

**7.标签**

用于直接检测人类CSF样本中肠病毒RNA的IVD器械的最终标记与其他器械一样需受制于有关标签的法定要求（该法案第502和201（n）节； 21 USC§§352，321（n）） 。用于检测肠病毒RNA的核酸扩增测定必须纳入特异性标签，其中应包括适当的说明、警告和预防措施（21 CFR 809.10）。

以下建议旨在帮助贵公司制备符合这些要求的标签。还建议将其作为缓解本指南以前确定的风险的措施，以帮助确保这些器械的安全和有效使用，特别是用于检测肠病毒RNA的核酸扩增测定的结果可能与脑膜炎的其他适应症不一致时[参考文件：6]。

贵公司的标签应清楚说明贵公司器械设计用于检测的肠病毒的特性、系统发育关系或其他公认特征，以及感染人类的相关临床方面。

***预期用途***

除说明所检测的分析物的特定成分之外，贵公司的预期用途应指定用于对来自具有脑膜炎或脑膜脑炎的体征和症状的患者的CSF样本进行测试的适应症，并且应指定该测定仅应与其他实验室试验和临床观察结合使用。FDA还建议贵公司通过提供警告声明来说明贵公司的预期用途声明，例如：“结果为阳性并不排除细菌或其他类型的感染，且该结果不应作为治疗或其他患者管理决定的唯一依据。

贵公司应该在“预期用途”下面和工具盒外箱标签上放置一个粗体的“注意”框，如下所示：

**注意：使用[申办方使用的测定名称]获得的结果应仅用作临床观察和医生可获得的其他信息的辅助信息。阳性[申办方使用的测定名称]结果并不排除脑膜炎的其它原因，包括细菌、分枝杆菌、其他病毒（例如疱疹病毒、虫媒病毒、腮腺炎病毒等）和真菌。**

***使用说明***

贵公司应该提供清晰简明的说明，以描述所检测到的肠病毒的相关性、特定器械的技术特性、使用试剂的程序以及将出现不准确结果的风险降到最低的对照类型。说明应鼓励使用额外控制措施以及对控制材料进行额外测试，确保器械的安全有效使用。

***预防措施，警告和局限性***

贵公司应该在标签中清楚说明任何测定局限性。本节应包括医生在开始试验之前需要了解的适当局限性和警告。我们建议贵公司在“结果”部分中结合与报告结果有关的说明，并提醒须向州或地方公共卫生部门报告结果（如果适用）。

*局限性：*

除与贵公司的特定检测相关的任何局限性和警告之外，贵公司还应在“局限性”部分提供以下类型的声明：

* 训练有素的医疗保健专业人员应该结合患者的病史、临床体征和症状以及其他诊断试验的结果来解释测定结果。
* 分析物靶标（病毒序列）可以在体内持续存在，其与病毒的活力无关。检测到分析物靶标并不意味着相应的病毒具有感染性，或是临床症状的致病因子。
* 由于在测定的病毒靶标中存在序列变体、程序错误、样本中的扩增抑制剂或用于扩增的微生物数目不足，存在假阴性值的风险。
* 应结合其他实验室结果（例如CSF葡萄糖，CSF革兰氏染色，CSF蛋白，CSF白细胞等）和临床体征或症状对阳性结果进行解释。结果为阳性并不排除脑膜炎的其他非EV原因。在罕见的情况下，脑膜炎可以由病毒和细菌或其他试剂的共同感染引起。同样，结果为阴性（例如，未检测到肠病毒核酸）并不排除其他类型的病毒（例如HSV）或细菌感染。
* 该测定可与人鼻病毒交叉反应，但鼻病毒不应存在于人脑脊液中，且不是脑膜炎的公认原因。
* 可能需要对肠病毒或细菌感染进行额外的试验。
* 对于肠病毒RNA呈阳性的结果不能明确确定肠病毒血清型。
* 如果样本未被正确采集、运输或处理，可能会出现假阴性结果。如果样本中存在的病毒数量不足，也可能会出现假阴性结果。
* 如果内部对照失效，则不应报告阴性结果。
* 阳性和阴性预测值高度依赖于患病率。当某一群体中因肠病毒引起的疾病患病率较低或不存在，或处于非肠病毒流行季节时，可能出现假阴性试验结果。
* 可能无法检测新的肠病毒血清型。

*患病率*

贵公司应该纳入试验的患病率以及对结果的解释。贵公司还应该总结用于确定患病率的研究，包括样本数、年龄、性别和人口统计资料。

*性能特性*

贵公司应在包装说明书中纳入第6节中所述的研究设计和研究结果的摘要，这将有助于用户解释试验结果。这可包括临床和分析性能特性。

**8. 参考文件**

 [1] 用于检测微生物病原体的、基于核酸的体外诊断取消 – 行业和FDA工作人员指南草案，指南于2005年12月8日发布，其网址为：http://www.fda.gov/cdrh/oivd/guidance/ 1560.html

 [2] 病毒（无菌）脑膜炎。疾病控制和预防中心：呼吸道和肠道病毒部。2004年10月15日。

 [3] Tunkel AR，Scheld WM。急性脑膜炎。Mandell GL，Bennett JE，Dolin R，编辑。传染病原理与实践，第6版。Philadelphia：Elsevier，2005：1083-6。

 [4] Romero JR，Rotbart HA。肠道病毒。Murray PR，Baron EJ，编辑。临床微生物指南，第8版。Washington， DC：美国微生物学会，2003年：1427-1438。

 [5] Modlin JF。柯萨奇病毒、诶克病毒和新型肠道病毒。Mandell GL，Bennett JE，Dolin R，编辑。传染病原理与实践，第6版。Philadelphia：Elsevier，2005：2148-2161。

 [6] Sawyer MH，Rotbart HA。病毒性脑膜炎和无菌性脑膜炎综合征。Scheld WM，Whitley RJ，Marra CM，编辑。中枢神经系统感染，第3版。Philadelphia，PA：Lippincott，Williams＆Wilkins，2004：75-93。

 [7]Tunkel AR 。可用于中枢神经系统感染患者的方法。Mandell GL，Bennett JE，Dolin R，编辑。传染病原理与实践，第6版。Philadelphia：Elsevier，2005年：1079-1083。

 [8] 临床和实验室标准研究所。病毒培养；获批指南 CLSI文件M41-A[ISBN 1562386239]。临床和实验室标准研究所，940 West Valley Road，Suite 1400，Wayne，Pennsylvania，19087-1898，USA 2006；第6.1节至第6.2节。

 [9] Pasloske BL，Walkerpeach CR，Obermoeller RD，Winkler M和DuBois DB。用于生产耐核糖核酸酶病毒RNA控制和标准的Armored RNA技术。临床微生物杂志， 1998年； 36：3590-3594。

 [10] 临床和实验室标准研究所。2006年。传染病分子诊断方法； 获批指南。CLSI文件MM3-A2[ISBN 1-56238-596-8]临床实验室标准研究所，Wayne PA。

 [11] 临床和实验室标准研究所。2004年。“测定检测限和定量限制的方案”； 获批指南。CLSI文件EP17-A[ISBN 1-56238-551-8]临床和实验室标准研究所，Wayne PA。

 [12] 临床和实验室标准研究所。2005年。临床化学干扰试验；获批指南。EP7-A2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。

 [13] 临床和实验室标准研究所。2004年。定量测量方法的精确性性能评价；获批指南 - 第二版。EP5-A2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。

 [14] 临床和实验室标准研究所。2002年。评价定性试验性能的用户协议；获批指南。EP12-A。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。

 [15] 临床和实验室标准研究所。2008年。用户验证精确性和真实性性能已；批准指南 - 第二版。EP15-A2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。

 [16] Haeckel R.关于临床化学中遗留效应说明和测量的建议。纯应用化学。1991年； 63：302-306。

 [17] 临床和实验室标准研究所。诊断实验室医学中的核酸测序方法；获批指南。CLSI文件MM9-A[ISBN 1-56238-558-5]临床与实验室标准研究所，Wayne PA。

1 即使贵公司已确定在贵公司的测定中可以使用一种或多种替代辅助试剂，每种所述替代物仍然可能是相关辅助试剂。如果贵公司不确定特殊控制的这一方面是否适用于贵公司器械，我们建议贵公司咨询FDA。

2  I类误差是真阴性样品给出指示分析物存在的值（具有零浓度的分析物）的概率。通常，I型误差设置为5％或以下。

3 护理点试验，也称为临床或近患者试验，是适用于中心实验室环境外但通常更靠近患者的替代站点或在患者所处的站点进行的试验。