**行业和FDA工作人员指南**

**确定用于检验或检验和分化流感病毒的体外诊断器械的性能特征**

**文件发布日期： 2011年7月15日**

**本文件草案于2008年2月15日发布**

如对本文件有疑问，请联系Tamara Feldblyum，电话：301-796-6195 或者发送邮件至 tamara.feldblyum@fda.hhs.gov.



**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
微生物器械部**

**前言**

**公共评论**

书面评论和建议可以随时提交给食品药品监督管理局文档管理部，5630 Fishers Lane，1061室（HFA-305），Rockville, MD, 20852。可以提交电子评论到[http：//www.regulations.gov](http://www.regulations.gov/)。请使用文档号FDA-2008-D- 0095识别贵公司的意见。可能直到文件下次修订或更新时，意见才会被机构受理。

**其他副本**

可从互联网[http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm070274.htm) [ucm070274.htm](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm070274.htm)获得其他副本。贵公司还可以发送电子邮件至dsmica@fda.hhs.gov索要指南的电子副本，或向301-847-8149发送传真索要硬拷贝。请使用文件编号1638来识别贵公司要求的指南。

**目录**

**[1.](#_Toc479504186)****[简介](#_Toc479504186)** [5](#_Toc479504186)

**[2.](#_Toc479504187)****[背景](#_Toc479504187)** [6](#_Toc479504187)

**[3.](#_Toc479504188)****[范围](#_Toc479504188)** [7](#_Toc479504188)

**[4.](#_Toc479504189)****[健康风险](#_Toc479504189)** [9](#_Toc479504189)

**[5.](#_Toc479504190)****[器械描述](#_Toc479504190)** [10](#_Toc479504190)

**[5.A](#_Toc479504191)****[预期用途](#_Toc479504191)** [10](#_Toc479504191)

**[5.B](#_Toc479504192)****[测试方法学](#_Toc479504192)** [10](#_Toc479504192)

**[5.C](#_Toc479504193)****[仪器- 硬件和软件](#_Toc479504193)** [11](#_Toc479504193)

**[5.D](#_Toc479504194)****[辅助试剂](#_Toc479504194)** [12](#_Toc479504194)

**[6.](#_Toc479504195)****[局限性](#_Toc479504195)** [13](#_Toc479504195)

**[7.](#_Toc479504196)****[对照](#_Toc479504196)** [14](#_Toc479504196)

**[8.](#_Toc479504197)****[解释和报告测试结果](#_Toc479504197)** [15](#_Toc479504197)

**[9.](#_Toc479504198)****[确定性能特征](#_Toc479504198)** [15](#_Toc479504198)

**[9.A](#_Toc479504199)****[分析性能](#_Toc479504199)** [15](#_Toc479504199)

**[9.A.i](#_Toc479504200)****[分析灵敏度](#_Toc479504200)** [15](#_Toc479504200)

**[9.A.ii](#_Toc479504201)****[分析特异性](#_Toc479504201)** [17](#_Toc479504201)

**[9.A.iii](#_Toc479504202)****[临界值和不确定区域](#_Toc479504202)** [20](#_Toc479504202)

**[9.A.iv](#_Toc479504203)****[精确度](#_Toc479504203)** [21](#_Toc479504203)

**[9.A.v](#_Toc479504204)****[剩余研究和交叉污染研究（用于需要仪器的多样本检验和器械）](#_Toc479504204)** [24](#_Toc479504204)

**[9.A.vi](#_Toc479504205)****[样本储存和运输条件](#_Toc479504205)** [24](#_Toc479504205)

**[9.B](#_Toc479504206)****[临床性能研究](#_Toc479504206)** [24](#_Toc479504206)

**[9.B.i](#_Toc479504207)****[研究方案](#_Toc479504207)** [25](#_Toc479504207)

**[9.B.ii](#_Toc479504208)****[研究人群](#_Toc479504208)** [26](#_Toc479504208)

**[9.B.iii](#_Toc479504209)****[标本](#_Toc479504209)** [26](#_Toc479504209)

**[9.B.iv](#_Toc479504210)****[新鲜样本vs.冷冻样本的评估](#_Toc479504210)** [28](#_Toc479504210)

**[9.B.v](#_Toc479504211)****[研究地点](#_Toc479504211)** [28](#_Toc479504211)

**[9.B.vi](#_Toc479504212)****[参考方法](#_Toc479504212)** [29](#_Toc479504212)

**[9.C](#_Toc479504213)****[上市后性能确认](#_Toc479504213)** [30](#_Toc479504213)

**[9.D](#_Toc479504214)****[CLIA豁免](#_Toc479504214)** [31](#_Toc479504214)

**[9.E](#_Toc479504215)****[基于核酸的流感试剂](#_Toc479504215)** [31](#_Toc479504215)

**[9.E.i](#_Toc479504216)****[核酸提取](#_Toc479504216)** [31](#_Toc479504216)

**[9.E.ii](#_Toc479504217)****[核酸基的流感检验的对照](#_Toc479504217)** [32](#_Toc479504217)

**[10.](#_Toc479504218)****[参考文件](#_Toc479504218)** [33](#_Toc479504218)

**行业和FDA工作人员指南**

**确定用于检验或检验和分化流感病毒的体外诊断器械的性能特征**

|  |
| --- |
| ***本指南代表食品药品监督管理局（FDA）目前对这一主题的思考。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。如果贵公司希望讨论一种替代方法，请联系负责实施本指南的FDA工作人员。如果贵公司无法确定适当的FDA工作人员，请拨打本指南标题页上列出的合适的电话号码。*** |

1. **简介**

FDA发布本指南草案，旨在为行业和工作人员提供建议，明确检验或检验和分化流感病毒的体外诊断器械（IVD）的分析和临床性能。这些器械用于帮助诊断流行性感冒。其包括检验一种特定类型或亚型的器械，以及检验一种以上流感病毒类型或亚型的器械，并进一步区分[[1]](#footnote-0)。

本指南提供有关FDA建议提交的数据类型的详细信息，支持I类和II类器械的上市前提交。指南包括推荐用于分析敏感性研究的流感病毒株列表，分析特异性研究的微生物列表，以及呈现交叉反应性研究数据的建议格式的示例。

本文件的范围仅限于旨在确定相关器械的性能特征的数据类型，这些器械用于检验流感病毒抗原或流感病毒基因片段。包括检验流感病毒蛋白质或核酸靶标的单检验格式或多检验格式的器械。但并没有涉及检验宿主对病毒抗原的血清学反应的检验性能，也不涉及多分析物或多重器械的非流感成分的性能。

FDA的指导性文件，包括本指南，不具有法律执行效力。然而，指导性文件说明FDA目前对某一主题的看法，除非引用具体的法规或法定要求，否则应仅视为建议。在FDA指导性文件中使用词语“应该”表示建议或推荐，但不是必需的。

1. **背景**

本文件建议研究确定/体外诊断器械的性能特征，用于直接从人类标本或从培养分离物中检验或检验和分化流感病毒。FDA认为，这些推荐的研究将与特定器械可能需要的上市前提交（例如510（k））相关。

计划销售用于检验，检验和分化流感病毒的体外诊断器械的制造商，必须遵守联邦食品、药品和化妆品法案（FD＆C法案）的一般控制（除非得到豁免），在销售器械之前获得上市前许可或批准（法案第510（k），513,515节；21 U.S.C. 360（k），360c，360e）。

本文件旨在补充21 CFR 807.87（上市前通告中需要的信息）和其他FDA资源，如“上市前通告：510（k）”，http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/HowtoMarketYourDevice/ PremarketSubmissions / PremarketNotification510k / default.htm；和“行业和FDA工作人员指南：传统510（k）和简化510（k）的格式” ，http：//www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/Guidanc eDocuments / ucm084396.pdf。

此外，本文件补充两份专门针对流感性体外诊断器械的FDA指导性文件：“用于检验甲型流感病毒的体外诊断器械：标签和法规流程”，（http：//www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/Guidanc eDocumentsZucm071270.pdf）和“II类特殊控制指导性文件：用于检验特异性新型甲型流感病毒的试剂”，（http：//www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments / ucm071274.pdf）。

指导性文件“检验流感病毒的体外诊断器械：标签和法规流程”涉及实现标签满足体外诊断器械预期检验接来自人类样本的甲型（或甲 / 乙型）病毒的要求，特别强调确保合法上市的甲型流感（或甲 / 乙型）检验试剂的适当标签，这些体外诊断器械的许可并不基于感染人类的新型甲型流感病毒（包括H5N1）的数据处理结果。指导性文件还讨论FDA对用于检验甲型流感病毒（包括新型甲型流感病毒）或检验和区分特异性甲型流感病毒的新产品或修改产品的上市前流程的思考。

指导性文件“II类特殊控制指导性文件：用于检验特异性新型甲型流感病毒的试剂”是检验特异性新型甲型流感病毒的试剂的两种特殊控制之一， 在21 CFR 866.3332中被归为II类。该特殊控制指导性文件包括对确定器械性能、标签和上市后措施的建议。21 CFR 866.3332中分类的器械需要额外的特殊控制，这些器械需要在有经验丰富的人员，合适的生物安全器械设备和器具的实验室中使用，其中实验人员需要经过标准化分子检验程序的培训，具有病毒诊断专业知识。

本指南旨在通过说明FDA建议用于检验或检验和分化流感病毒的体外诊断器械（IVDs）的分析和临床性能的研究类型来补充前述两项指导性文件。FDA建议，流感诊断器械的申办者将本指南结合现有关于流行性感冒诊断的两条指南，了解FDA目前对这些器械的监管想法。

1. **范围**

如上所述，本文件建议研究用于检验或检验和分化流感病毒的性能特征，包括用于检验人类标本或培养物中新型流感病毒的体外诊断器械。本文件仅限于旨在确定检验流感病毒抗原或流感病毒基因片段（蛋白质或核酸）的器械的性能特征研究。本指南涉及血清试剂，但不涉及从宿主到病毒抗原的血清反应的检验，也不涉及确定多分析物或多重器械的非流感成分的性能。

本文件的范围包括现有分类中所述的器械，如下所示，也可能适用于未来归为现有分类的流感诊断器械。这种器械可能包括根据法案（“重新分类”）第513（f）（2）条的要求进行初始分类的器械，以及随后的寻求与未来重新分类的实质等同性的器械。

以下是目前流感体外诊断器械的分类法规：

**21 CFR 866.3330流感病毒血清试剂：**

（a）识别。流感病毒血清试剂是在血清学检验中用于识别血清中流感抗体的抗原和抗血清的器械。这项识别有助于流感的诊断，并提供有关流行性感冒的流行病学资料。流感是一种急性呼吸道疾病，并通常是流行性疾病。

（b）分类。I类（一般控制）。该器械免于本章第807. E节的上市前通告程序，但是必须符合第866.9条的局限性。

虽然21 CFR 866.3330说明的分类器械是一般免于上市前通告的I类器械（21 USC 360（l）），但是根据FDA的规定，一些属于此类的器械检验可能需要提供上市前通告。具体来说，用于检验流行性感冒的体外诊断器械符合21 CFR 866.9中规定的豁免局限性，但不能免于提交510（k）：

* 根据21 CFR 866.9（c）（6），体外诊断器械预期用于直接从临床材料识别或推断微生物的类型，不能免除上市前通告的要求。旨在直接从人体标本检验流感病毒的体外诊断器械属于此条款。
* 此外，如果新器械预期用途不同于21 CFR 866.3330法规规定的合法上市的器械的预期用途，检验流行性感冒的体外诊断器械可能会影响21 CFR 866.9（a）的局限性。或者如果与分类的现有流感检验使用不同的基本科学技术，也可能会影响21 CFR 866.9（b）的局限性。

以下是21 CFR 866.3330许可的器械的产品代码：

GNS – 抗血清，HAI，流感病毒甲型，乙型，丙型

GNT - 抗原，HA（包括HA对照），流感病毒甲型，乙型，丙型

GNX - 抗原，CF，包括CF对照，流感病毒甲型，乙型，丙型

GNW – 抗血清，CF，流感病毒甲型，乙型，丙型

NIA - 核酸扩增，流感病毒

**21 CFR 866.3332检验特异性新型甲型流感病毒的试剂**

（a）识别。检验特异性新型甲型流感病毒的试剂旨在用于核酸扩增试验以直接检验人体呼吸系标本或病毒培养物中的特异性病毒RNA。特异性病毒RNA的检验有助于针对有临床风险感染特异性新型甲型流感病毒的患者，诊断由于上述病毒而引起的流感，此外也有助于实验室鉴定特异性新型甲型流感病毒提供有关流感的流行病学信息。这些试剂包括引物、探针和特异性甲型流感病毒对照。

（b）分类。II类（特殊控制）。特殊控制是：

（1）FDA的指导性文件“II类特殊控制指导性文件：用于检验特异性新型甲型流感病毒的试剂”，有关获取本文件的内容，请参见第866.1（e）节。

（2）这些器械仅限于配有有经验人员和适当的生物安全设备和器具的实验室，这些人员具有标准化的分子检验程序和病毒诊断专业知识。

以下是21 CFR 866.3332许可的器械的产品代码：

NXD - 核酸扩增，新型甲型流感病毒，A / H5（亚洲谱系）RNA

OMS - 新型甲型流感病毒，A / H5 NS1蛋白

1. **健康风险**

流感对于人类是一种高度传染性的急性呼吸道疾病。人类流行性感冒病毒有三种：甲型，乙型和丙型。感染甲型流感病毒是最严重的，在过去一个世纪里发生过几起严重的流行疾病。甲型流感病毒根据病毒包膜上的红细胞凝集素（HA）和神经氨酸苷酶（NA）糖蛋白的抗原成分归类为亚型。

普遍流行性流感病毒引起的疾病可能导致高发病率和死亡率，特别是在特殊人群（如老年人和儿童）中。由于流感病毒每年都以微小而重要的方式发生突变（称为抗原性漂移），季节性流感病毒的获得性免疫发展十分有限。更剧烈的变化或主要的抗原性漂移可能导致出现新型甲型流感病毒亚型，或者几十年来从未流行或尚未流行于人类的新型病毒。新型流感病毒有可能导致疾病的传播和/或异常严重的疾病，这是因为很少有人（如果有的话）曾经接触到这些病毒。这种免疫力的缺乏以及可能增加毒力的其他致病因素导致感染者可能产生更大的发病率和死亡率。

用于检验或检验和分化流感病毒的体外诊断器械对于确定流行性感冒的诊断、区分季节性与新型流感病毒株，以及获得关于流感爆发的流行病学信息很重要。公共卫生官员强调，可靠的流感诊断试剂可以区分季节性与新型病毒株，并提供快速的检验结果。

器械未能如预期检验流感病毒或未能正确解释结果，则可能导致错误的患者管理决策以及不当的公共卫生反应。针对个体患者，假阴性报告可能导致延误（或者未采取）确定性诊断、适当的治疗以及感染控制和预防措施。假阳性报告可能导致不必要或不适当的治疗或控制和预防措施。因此，确定这些器械的性能并了解使用这些器械可能存在的相关风险对于安全有效地应用至关重要。

建议本指南文件中说明确定流感检验器械性能的研究，支持上市前提交和FDA对这些器械的实质等同性的判定。

1. **器械描述**

贵公司需在510（k）提交资料中识别合法上市的比较器械。21 CFR 807.92（a）（3）。贵公司还应识别器械的法规和产品代码。我们建议贵公司通过列表展示比较器械与新器械之间的相似点和差异性。贵公司应提供以下说明性信息，充分表征旨在检验或检验和区分流感病毒的新器械。

**5.A 预期用途**

预期用途应指明器械检验和识别的流感病毒类型和亚型，分析物的性质（例如抗原或RNA），检验平台，检验显示的样本类型，应用检验的临床适应症，以及检验所针对的具体人群。预期用途应说明检验是否是定性的，分析物检验是否是推定，以及所有特定的使用条件。

**5.B 测试方法学**

贵公司应该详细说明器械使用的方法。例如，包括适用于该器械的以下组成：

* 技术说明（例如免疫检验，RT-PCR，微球技术）以及该器械是手动检验还是在仪器上运行。
* 选择特异性靶标的信息和依据以及用于设计抗体或引物和探针的方法。
* 流行性感冒或目标核酸序列的捕获和检验试剂的特异性。
* 样本类型和收集方法（例如，药签，抽吸物，病毒培养基等）。
* 提供或推荐使用的试剂组分及其在系统内的功能（例如，缓冲液，酶，荧光染料、仪器和软件）。
* 内部控制及其在系统中的具体功能的说明。
* 推荐或提供给用户的外部控制。
* 由器械和系统参数生成的输出类型（例如，测量范围、单位（适用时））。
* 从原始数据到报告结果的计算路径（有关详细信息，请参见“仪器-硬件和软件”下的5.C节）。
* 非标准器械或方法的插图或照片。

贵公司的510（k）提交资料中应包括性能信息，支持符合器械设计控制要求21 CFR 820.30的结论。

**5.C 仪器- 硬件和软件**

对于测量多个信号的仪器和系统，以及尚未许可的其他复杂实验室仪器，请参阅“II类特殊控制指导性文件：临床多重检验系统的仪器”[1] 。贵公司应提供仪器的相关数据，支持许可。

如果贵公司的器械包含软件，则应根据FDA指导性文件“医疗器械中软件的上市前提交的内容指南” [2]所述关注水平来提交软件信息。贵公司应该在降低危害之前确定关注水平。这种类型的体外诊断器械通常被认为是中等程度的关注水平，因为软件缺陷可能间接地影响患者，并且可能由于向医务人员和患者提供不准确的信息而导致损伤。

贵公司应该清楚说明原始信号如何转换为结果，包括调整背景信号以进行归一化（如果适用）。我们还建议贵公司在提交资料中包括以下软件开发和实施的信息：

* 系统和软件要求
* 危害分析
* 设计模块架构图
* 软件设计规格书
* 软件开发环境说明
* 验证和确认
* 可追溯性分析
* 未解决的异常

在开始临床研究之前，硬件和软件组件的配置应该与器械的最终版本非常相似或相同。如果在完成临床研究之后以及在许可和分销器械之前对硬件或软件进行任何重大改变，则应进行风险评定。

以下附加参考资料可协助贵公司根据符合FDA法规的软件生命周期规范研发和维护器械。

* 软件验证的一般原则；行业和FDA工作人员的最终指南；http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments / ucm085281.htm
* 医疗器械中现有软件使用指南；最终版；[http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDo cuments / ucm073778.htm](http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDo%20cuments%20/%20ucm073778.htm)
* 21 CFR 820.30 C子部分 - 质量体系法规的设计控制。[http：//www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cf](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=820.30) [m?FR=820.30](http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=820.30)
* ISO 14971-1；医疗器械 - 风险管理 - 第1部分：风险分析的应用
* AAMI SW68：2001；医疗器械软件 - 软件生命周期过程。

**5.D 辅助试剂**

辅助试剂是在器械标签中指明为“必需但未提供”的那些试剂，以便进行使用说明书中所示的检验。对于本文件，特异性辅助试剂是指由贵公司指定目录或产品编号，或其他特定的贵公司器械所需的试剂，以实现其标签的性能特征。例如，如果贵公司的器械标签规定使用X品牌或其他已经由FDA批准用于此特定器械的扩增酶，并且使用任何其他DNA扩增酶可能会改变标签中说明的器械性能特征，则依据本文X品牌DNA扩增酶属于特异性辅助试剂。相比之下，如果贵公司的器械需要使用95%乙醇，而任何类型的95%乙醇都可以使贵公司的器械达到标签所说明的性能特征，则95％的乙醇不是辅助试剂。

如果器械的使用说明书指定特异性辅助试剂，则应依据说明书说明如何确保贵公司器械的检验结果和这些特异性辅助试剂，与上市前提交确定的性能相一致 。应尽量在质量管理体系中包含辅助试剂，建议仅使用贵公司已确定符合检验质量标准的辅助试剂。贵公司的计划中可以应用质量管理体系、产品标签和其他措施。贵公司应在提交资料中详细说明以下因素。

1. 涉及使用辅助试剂的风险评定，包括与试剂质量和变异性管理相关的风险，随特异性辅助试剂直接提供的使用说明书与随贵公司器械提供的使用说明书之间不一致的风险，以及其他任何可能会导致贵公司器械产生不正确结果的风险。
2. 以风险评定为依据，贵公司应该在510（k）提交资料中介绍如何通过对辅助试剂实施必要控制来降低风险。这可能包括：
* 计划评估用户是否遵守特异性辅助试剂的标签说明。
* 标签中辅助试剂的材料规格。
* 识别贵公司器械被允许的适当性能的试剂批次。
* 稳定性检验。
* 投诉处理。
* 纠正和预防措施。
* 如果发生涉及辅助试剂的问题，将影响用户性能的计划。
* 任何其他必须解决的问题，确保根据贵公司器械的使用说明，可以安全有效地与指定的辅助试剂结合使用进行检验。

此外，贵公司应提供检验数据，以确定提供或推荐的质量控制足以检验特异性辅助试剂的性能或稳定性问题。

1. **局限性**

贵公司必须在产品附带的标签中包含使用程序的局限性声明（21 CFR 809.10（b）（10））。包括潜在可能影响器械性能的问题，在分析或临床研究中没有得到解决。贵公司应该在器械标签的“警告和局限性”部分中包含与使用器械相关的潜在风险。我们建议贵公司在器械上列出如下相关声明：

* 病毒核酸[或病毒抗原]的检验取决于样本收集、处理、运输、储存和制备，包括提取。在任何一个步骤中不遵守正确的程序可能会导致错误的结果。
* 阴性结果不排除流感病毒感染，不应作为治疗或其他患者管理决策的唯一依据。
* [器械名称]的结果应与临床医生对患者临床病史的评估、流行病学资料和其他资料结合判断。
* 病毒核酸可以在人体内保持独立于病毒的活力。检验分析物靶标并不意味着相应的病毒是感染性的，或是临床症状的致病因子。
* 本器械仅用于人体标本材料。
* 如果临床样本中的微生物数量低于器械的检验限，那么可能会产生假阴性结果。
* 如果病毒在目标区域发生变异，则可能无法检验到流感病毒，或者不太可能预测发现流感病毒。
* 该器械是定性检验，不提供样本中存在的病毒载量。
* 该器械的性能尚未被没有流感感染体征和症状的患者评估。
* 该器械的性能尚未被评估用于监测流感感染的治疗。
* 该器械的性能尚未被评估用于筛查血液或血液制品的流行性感冒。
* 该检验不能排除其他细菌或病毒病原体引起的疾病。
* 仅评估了干扰物质对标签中所列物质的影响。下述物质的干扰可能会导致错误的结果。
* 与呼吸道微生物的交叉反应性，以下列出的[在标签中]可能导致错误的结果。
* 接受鼻内流感疫苗的患者尚未参与评估该器械的性能。
* 该器械的性能尚未被评估为免疫受损个体。
* 感染的流行将影响检验的预测价值。
1. **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检验。适当的外部对照例如疫苗或原型疫苗株、低致病病毒和灭活的病毒。有关核酸基器械对照的具体信息，请参见本指南文件第9.E节“核酸基流感检验的对照”。贵公司可以联系FDA体外诊断器械评估与安全（OIVD）办公室的微生物器械部，以获取有关对照的更多信息。

1. **解释和报告测试结果**

我们建议贵公司在提交资料中说明如何确定阳性、阴性或者不确定结果以及如何解释。同时建议贵公司指出检验所有输出的临界值，包括用于定义检验阴性（或阴性/阳性）结果的临界值。如果检验具有不确定区域，则还应定义不确定区域的临界值（极限值）。如果贵公司需要对初始不确定结果重新检验，则应提供（1）是否应从相同的核酸构建重新进行检验、新提取、或是否应检验新的患者样本，以及（2）通过组合初始不确定结果和重新检验后的结果来定义最终结果的算法。请注意，该算法应关键临床研究之前开发，并且在临床期间应该精确地遵循该算法。（例如，执行重新检验、新提取或采集新的患者标本）研究器械的性能评估。

如果检验结果被读取或报告为“无效”，则应说明如何定义无效结果。如果对照是确定无效结果的一部分，则应说明用于定义无效结果的每个可能的对照结果组合。贵公司应该提供关于如何跟踪无效结果的建议，即结果是否应报告为无效或者需要重新检验样本。如果推荐重新检验，那么请提供类似于重新检验的不确定结果的信息（是否需要从相同的核酸制备、新提取、或是否应检验新的患者样本）。贵公司应在提交资料中列出初始无效结果的数量以及在研究期间确定最终结果所需的重新检验次数。关于结果评估和报告的其他信息请参见CLSI文件ILA 18-A2 [3]。

1. **确定性能特征**

**9.A 分析性能**

我们建议贵公司为检验确定以下分析性能特征：

**9.A.i 分析灵敏度**

*检验限*

检验限（LoD）定义为限定类型的样本中可以持续检验到的最低分析物浓度（通常在常规临床实验室条件下检验样本为> 95%）。贵公司应为每种样本类型和每种分析物确定检测限，评估验检测限时，上述样本和分析物是指器械在整个检验系统中，从样本制备到检验所使用的。这可以通过局限性传播和滴定病毒种群的稀释来实现。该研究应包括代表每种所要求的流感病毒的类型或亚型的至少两个菌株的系列稀释（对于建议的病毒株，请参见表1），每次稀释重复3-5次。我们推荐用于检测限检验的参考方法是组织培养感染剂量50（TCID50），卵感染剂量50（EID50）或斑块检验。由于核酸基器械不仅检验感染性病毒颗粒，而且检验样本中存在的总病毒RNA。另外的参考方法是，定量核酸（例如，病毒RNA的基因组拷贝当量或者μ g / mL）也可包括在内。贵公司应该将病毒水平检测限报告为95％的检验率。应通过在检测限浓度下使用至少20次额外重复，显示95%的检验率来确认检出限。

我们建议贵公司确定器械检验最常用或最具挑战性的基质中每种分析物的检测限。贵公司可以参考临床实验室标准研究所（CLSI）文件EP17-A [4]，了解研究设计的实例。为分析研究选择适合适的基质时，贵公司应该考虑以下两种选择之一：

1. 可以收集阴性人类临床呼吸系标本以构造大体积的均匀样本基质（例如由剩余NP药签临床样本制备的阴性鼻咽（NP）池）。收集的基质应在加标之前进行筛选。
2. 如果贵公司能在研究中通过模拟基质和含有病毒的天然临床基质，证明测定的分析性能相当，则可以使用病毒运送培养基（VTM）或另一种模拟基质。研究可以在内部进行（即在您自己的公司内），并且包括有限数量的样本（例如60个）

*分析反应性（包容性）*

我们建议贵公司证明，贵公司的器械可以检验到至少5株乙型流感病毒，对于每种甲型流感亚型，至少10株。应在所有感染人群的亚型和在检测限处或附近的病毒水平检验甲型流感。应包括代表两个谱系的乙型流感菌株（Victoria系和Yamagata系）。选择的流感毒株应反映时间和地域多样性，重点是现代的菌株。对于每种要求的流感亚型，应包括代表已知谱系和进化枝的附加选择菌株。对于难以获得足够数量的菌株以显示反应性的亚型，我们建议贵公司联系微生物学部就贵公司的研究进行讨论。所有病毒的类型和滴度应予以确认。有关病毒培养和识别程序的更多信息，请参见CLSI文件M41-A [5]和WHO手册[6]。

推荐检测限和反应性研究使用的菌株的实例见表1。可以包括最近流感季节的疫苗株（野生型）。疫苗菌株可能因流感季节而异。目前，疫苗菌株的信息可从疾病控制和预防中心（CDC）获取，网址为：http：//www.cdc.gov/flu/professionals [7] 。

**表 1. 用于分析灵敏度（LoD）研究的流感病毒株的实例。**

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| **类型** | **亚型** | **流感病毒菌株** |
| A | H1N1 | A/加利福尼亚/7/2009 （H1N1） |
| A | H3N2-like | A/珀斯/16/2009 （H3N2）\* |
| B | B-like | B/布里斯班/60/2008 |
| A | H1N1 | A/PR/8/34 |
| A | H1N1 | A/FM/1/47 |
| A | H1N1 | A/NWS/33 |
| A | H1N1 | A1/丹佛/1/5 7 |
| A | H1N1 | A/新喀里多尼亚/20/1999 |
| A | H1N1 | A/新泽西/8/76 |
| A | H1N1 | A/布里斯班/59/2007 |
| A | H1N1 | A/夏威夷/15/2001 |
| A | H3N2 | A/查尔姆港/1/73 |
| A | H3N2 | A/香港/8/68 |
| A | H3N2 | A2/爱知县2/68 |
| A | H3N2 | A/维多利亚/3/75 |
| A | H3N2 | A/纽约/5 5/2004 |
| A | H3N2 | A2/威斯康辛州/67/2005 |
| B |  | B/马来西亚/2506/2004 |
| B |  | B/李/40 |
| B |  | B/艾伦/45 |
| B |  | B/GL/1739/54 |
| B |  | B/台湾/2/62 |
| B |  | B/香港/5/72 |
| B |  | B/马里兰州/1/59 |
| A | H5N1 | 人类和/或禽类 |
| A | H5N2 | 禽类 |
| A | H7N2 | 人类和/或禽类 |
| A | H7N7 | 人类和/或禽类 |
| A | 其他亚型 | 人类和/或动物物种 |

\* A /威斯康辛州/ 15/2009是A / 珀斯 / 16/2009（H3N2）的类病毒，是2010年南半球疫苗病毒。

**9.A.ii 分析特异性**

*排他性*

我们建议贵公司说明其检验的分析特异性，贵公司的器械无法检验的流感类型和亚型。排他组可能由贵公司的器械未检验到的表征的季节性或新型流感病毒以及已显示感染人类的非人类流感病毒组成。关于核酸基器械，对难以培养的大量组或流感病毒株而言，纯化的核酸可被定量，例如，基因组拷贝/ mL，而不是确定病毒滴度。在研究中使用高度纯化的流感病毒，也可以量化核酸，例如，蔗糖梯度纯化流感病毒。

*交叉反应性*

我们建议贵公司检验与非流行性感冒呼吸道病原体和其他大多数人群可能感染的微生物的潜在交叉反应性。我们建议贵公司确认病毒和细菌的类型和滴度，并在医学相关浓度（通常为106 cfu / ml或更高的细菌、105 pfu / ml或更高的病毒）上检验微生物。推荐用于交叉反应性研究的微生物见表2。关于核酸基器械，对难以培养的大量组或流感病毒株而言，纯化的核酸可被定量，例如， 基因组拷贝/ mL，而不是确定病毒滴度。在研究中使用高度纯化的流感病毒，也可以量化核酸，例如，蔗糖梯度纯化流感病毒。

**表 2. 推荐用于分析特异性（交叉反应性）研究的微生物**

|  |  |
| --- | --- |
| **微生物** | **类型** |
| 腺病毒 | 1型 |
| 腺病毒 | 7型 |
| 人类冠状病毒\* | OC43 和 229E 菌株 |
| 巨细胞病毒 |  |
| 肠病毒 |  |
| 爱泼斯坦病毒 |  |
| 人类副流感 | 1型 |
| 人类副流感 | 2型 |
| 人类副流感 | 3型 |
| 麻疹 |  |
| 人类偏肺病毒 |  |
| 腮腺炎病毒 |  |
| 呼吸道合胞病毒 | B型 |
| 鼻病毒 | 1A型 |
| *百日咳博德特氏菌* |  |
| *肺炎衣原体* |  |
| *棒状杆菌* |  |
| *大肠杆菌* |  |
| *嗜血杆菌流感* |  |
| *乳杆菌属* |  |
| *军团菌属* |  |
| *卡他莫拉菌* |  |
| *结核分枝杆菌* | 无毒 |
| *支原体肺炎支原体* |  |
| *脑膜炎奈瑟菌* |  |
| *奈瑟菌属* |  |
| *铜绿假单胞菌* |  |
| *金黄色酿脓葡萄球菌* | 蛋白A制造者，例如Cowan菌株 |
| *表皮葡萄球菌* |  |
| *肺炎链球菌* |  |
| *化脓性链球菌* |  |
| *唾液链球菌* |  |

对于检验多种分析物（例如甲型流感和乙型流感以及甲型流感的每种亚型）的器械，贵公司应确定检验到的类型和亚型之间不存在交叉反应。我们鼓励申办者以表3所示的格式提供检验多种病原体的器械的交叉反应性检验数据。

**表 3. 数据呈现实例**

|  |  |
| --- | --- |
| **实例** | 参考试剂，结果阳性（+）或阴性反应性 |
| 微生物 | 菌株 | 阿德诺 | 甲型流感 | 乙型流感 | Para 1 | Para 2 | Para 3 | 呼吸道合胞体病毒 |
| 腺病毒 | 1型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 3型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 5型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 6型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 7型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 10型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 13型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 14型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 18型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 31型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 40型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 41型 | + | - | - | - | - | - | - |
| 甲型流感 | 爱知县（H3N2） | - | + | - | - | - | - | - |
| 马来西亚（H1N1） | - | + | - | - | - | - | - |
| 香港（H3N2） | - | + | - | - | - | - | - |
| 丹佛（H1N1） | - | + | - | - | - | - | - |
| 查尔姆港（H3N2） | - | + | - | - | - | - | - |
| 维多利亚（H3N2） | - | + | - | - | - | - | - |
| WS（H1N1） | - | + | - | - | - | - | - |
| PR（H1N1） | - | + | - | - | - | - | - |
| 乙型流感 | 香港 | - | - | + | - | - | - | - |
| 马里兰州 | - | - | + | - | - | - | - |
| Mass | - | - | + | - | - | - | - |
| 台湾 | - | - | + | - | - | - | - |
| GL | - | - | + | - | - | - | - |
| 俄罗斯 | - | - | + | - | - | - | - |
| 呼吸道合胞体病毒 | Long | - | - | - | - | - | - | + |
| Wash | - | - | - | - | - | - | + |
| 9320 | - | - | - | - | - | - | + |

*干扰*

我们建议贵公司对每种流感类型使用医学相关浓度的干扰物和至少两种菌株进行全面的干扰研究，以评估呼吸道标本中物质的潜在抑制作用。

潜在的干扰物质包括但不限于：血液、鼻分泌物或粘液，以及用于缓解充血、鼻发干、刺激或哮喘和过敏症状的鼻部和喉部药物。潜在的干扰物质的实例如下表4。我们建议贵公司为自己产品确定每种流感病毒类型/亚型和每种干扰物质的临界值。我们还建议贵公司在潜在最高浓度下评估每种干扰物质（“最坏情况”）。如果没有观察到显著效果，则不需要进一步的检验。有关其他信息，请参阅CLSI文件EP7-A2 [8] 。

**表4.建议进行干扰研究的物质**

|  |  |
| --- | --- |
| **物质** | **有效成分** |
| 粘蛋白：牛下颌腺，I-S型 | 纯化的粘蛋白 |
| 血液（人类） |  |
| 鼻喷雾剂或滴剂 | 去氧肾上腺素，羟甲唑啉，氯化钠与防腐剂 |
| 鼻皮质类固醇 | 倍氯米松，地塞米松，氟尼缩松，曲安奈德，布地奈德，莫米松，氟替卡松 |
| 鼻凝胶 | 具盖丝瓜, 硫磺 |
| 顺势疗法过敏药 | 金英花, 盐酸组胺 |
| 流感疫苗鼻腔喷雾剂 | 活性鼻内流感病毒疫苗 |
| 咽喉锭剂，口服麻醉剂和镇痛药 | 苯佐卡因，薄荷醇 |
| 抗病毒药物 | 扎那米韦 |
| 抗生素，鼻软膏 | 莫匹罗星 |
| 系统性抗菌 | 妥布霉素 |

**9.A.iii 临界值和不确定区域**

在贵公司的提交资料中，贵公司应该解释如何确定和验证该检验的临界值（另见第8节“解释和报告检验结果”）。应使用适当的统计方法确定临界值。例如，可以提供临床样本的结果分布，95%和99%的非阴性结果（阳性或不确定）和其他统计学结果，这些临床样本在贵公司的试点研究中没有检验到任何呼吸道病毒（零分析物浓度）。基于临床样本的试点研究的受试者工作特征曲线（ROC）分析，可以通过相关的灵敏度和特异性水平选择适当的临界值（关于受试者工作特征曲线分析的详细信息，请参见CLSI文件GP10-A [9] ）。如果检验具有不确定的区域，贵公司应该解释如何确定不确定区域的极限。使用预先确定的临界值（如果适用），贵公司器械的性能应该在与定义的器械预期用途一致的独立研究中验证。

**9.A.iv 精确度**

我们建议贵公司提供证明系统精确度（即重复性和重现性）的数据。CLSI文件EP5-A2 [10]和EP12-A2 [11]包括相关指南，可能有助于开发适当的统计实验设计、计算和确定性能要求的格式。应为提交的器械检验的每种流感病毒型和亚型确定精确度。应检查所有可能影响检验精确度的变量。

*地点-地点重现性*

重现性研究的方案可能会根据检验方式略有不同，但应包括以下所有主要变异性来源的评估：

* 地点-地点和操作者-操作者的精确度：贵公司应该在每一地点包含三个或更多的地点（至少两个外部地点和一个内部地点），每个地点有多名操作者。操作者在教育和经验方面能够代表最终用户。贵公司应该提供与检验上市后用户相同程度的培训。我们建议，对于快速检验或即时检验（POC）[[2]](#footnote-1)器械，贵公司可以包含更多的检验和操作者进行评估，以便最好地代表器械的使用设置。
* 日常变异性。检验应该连续五天进行，每天至少进行两次运行（除非检验设计排除每天的多次运行），并三次重复运行每个组分，以评估运行间组分的不精确度。运行变异性可能与操作员变异性相结合，例如，每次运行都可以由不同的操作员执行。
* 提取 - 提取变异性。对于需要提取步骤（如核酸扩增检验）的器械，重现性检验中使用的样本在试验现场从临床样本（例如鼻咽药签）使用贵公司计划在检验标签中推荐的程序处理。如果推荐使用多个提取程序，则应分别在每个地点评估每种提取方法（另见第9.E节“核酸提取”）。
* 检验样本组应显示贵公司器械在三种病毒载量水平检验到的流感病毒的类型和亚型，包括分析物或接近检验临界值的输出浓度。在由剩余临床标本制备的阴性临床基质池里加入病毒来制备重现性组。
1. 分析物浓度低于临床确定的临界值的“高阴性”样本（C5浓度），使得该样本的重复检验约95%的结果为阴性，约5%的结果为阳性 （例如，对于分析物浓度不超过临床检验临界值10倍的实时PCR检验样本）。
2. 分析物浓度高于临床确定的临界值的“低阳性”样本（C95浓度），使得该样本的重复检验约95%的结果为阳性。
3. “中度阳性”样本应反映临床相关的病毒载量[[3]](#footnote-2)。在这个浓度下，大约100%可以预期阳性结果（例如临床确定的截止浓度的大约2到3倍）。
* 对于根据真正的阴性样本（零浓度）不能确定临床临界值的超敏感试验，可能无法获得C5样本。对于这样的器械，可以在精确度/再现性研究中检验以下两个浓度水平，代替上述推荐的C5浓度：
1. “阴性”样本：分析物浓度低于临床临界值的样本，使得该样本的重复检验结果为100%为阴性，如果小于10%的临床样本为阳性，参考方法在低于对应检测限的循环阈值（Ct）的实时PCR检验中给出结果，
或者
2. “近临界值”样本（C20至C80）：分析物浓度高于或低于检验临界值的样本，使得该样本的重复检验结果为阳性约20%至80% ，如果超过10%的临床样本为阳性，通过参考方法给出低于对应检测限的循环阈值的结果。

当空白限（LoB）[[[4]](#footnote-3)](#bookmark3" \o "Current Document)用作临界值时，浓度C95与检验限（LoD）相同，如果LoB估计的I类误差为5% [[[5]](#footnote-4)](#bookmark4" \o "Current Document) [4]，零浓度（样本中没有分析物）为C5。

我们建议贵公司提供研究设计和统计分析的详细说明。对于在精确度研究中需考虑的因素（例如仪器校准、操作者），建议使用平衡因子设计，即精确度研究包括这些因素的所有可能的组合。例如，如果使用两名操作者/操作者和三个地点进行五天的精确研究，那么五天乘以两名操作者/运行乘以三个地点，这等于评估的不同水平因子的30个组合。如果使用3次重复来评估每个组合，那么本研究中每一组分有90个结果。一般对于定性检验来说，应该使用适当的统计模型和方法来估计方差分量，这些统计模型和方法针对精密研究中考虑的每个因素。应该说明混合的变异性来源以及整体变异性，包括所有的因素。对于具有潜在定量输出的定性检验，通常使用方差分析来测量每个变异来源的变量的分量，以及总变异度。对于精密研究中的每个组分，贵公司应该通过地点和地点组合数据进行单独的分析，包括每个方差分量估计（标准偏差和百分比CV）的平均值以及总方差。例如，对于组合的地点数据分析，如果使用每次运行两名操作者和每次运行三次重复，在三个地点五天内进行精密研究，则提供地点到地点，天到天，操作员/运行到操作员/运行以及残留（复制到复制）总方差和方差分量的平均值，标准偏差和百分比CV。此外，对于每一组分，贵公司应该分别为每个地点和所有地点组合提供上下界限值以及无效结果百分比。如果适用的话，贵公司还应为每个地点和所有地点的精确度研究中的每一组分提供不确定的结果百分比。CLSI文件EP15-A2 [12]包含有关重现性研究设计的附加信息。

*实验室内精确度/重复性*

我们建议贵公司对包含仪器或自动化组件的器械进行实验室内精密研究。这些研究可以在内部进行，即在贵公司自己的公司内进行。建议贵公司检验变异性的来源（如操作员、日期、检验运行等）至少12天（不一定是连续的），每名操作者每天执行两次运行（总共4次运行/天），两次重复运行每个样品，每一检验组分总共96个结果。如果校准周期短于两个月，这些检验日应该跨越至少两个校准周期，并且也应该在单个校准周期内表示不同的时间点。我们建议贵公司使用与上述“地点-地点重现性”一节中所述的相同的示例组。也建议使用平衡因子设计；也就是说，精确度研究应该包括操作者、运行和日期的所有可能的组合。例如，由两位操作者进行两次运行，精确研究超过12天。在这个例子中，12天时间，两名操作者两次运行，等于评估每一因素的48个不同水平的总组合。如果每个组合都以两次重复进行评估，那么本研究中每一组分有96个结果。对于这两次重复，所有变异性的潜在来源因素应保持不变。我们建议贵公司以类似于“地点-地点重现性”一节所述的方式报告这些结果。

**9.A.v 剩余研究和交叉污染研究（用于需要仪器的多样本检验和器械）**

对于需要仪器的多样本检验和器械，贵公司应证明器械不会发生剩余和交叉污染。在剩余和交叉污染研究中，我们建议高阳性样本与阴性样本串联使用，类型取决于器械的操作功能。至少运行五次交替的高阳性（在临床标本中发现的最高病毒载量或至少为105pfu/ml）和高阴性样本（如上述“地点-地点 重现性”部分所定义）。我们建议研究中的高阳性样本足够高到超过95%或更多的从预期使用患病患者人群标本获得的结果。在超敏感器械的情况下，高阴性样本可能被替换为阴性样本（有关其他说明，请参阅上述“地点-地点 重现性”部分）。剩余和交叉污染效应可以通过在剩余研究中阴性样本的阴性结果的百分比来估计[13]。

**9.A.vi 样本储存和运输条件**

如果贵公司推荐样本储存和运输条件，则应证明器械在推荐的储存和运输期间的多个时间点，在推荐的温度的两端范围都产生相同的结果。如果贵公司推荐使用病毒运送培养基（VTM）进行存储或运输，则应进行适当的研究并提供数据显示推荐一个或多个病毒运送培养基是适宜的，并且当样本保存在推荐的病毒运送培养基中时，器械可以正常运行[5]。贵公司应该在包装说明书中表明可接受的病毒运送培养基的商业来源或化学成分。

**9.B 临床性能研究**

我们建议贵公司进行前瞻性临床研究，以确定器械的性能，与已确定的所有流感类型和亚型参考方法以及贵公司在标签中声明的每种标本类型相比较[[[6]](#footnote-5)](#bookmark5" \o "Current Document)。

**9.B.i 研究方案**

我们建议贵公司在上市前提交详细的研究方案，说明：

* 患者纳入和排除标准。
* 所需标本的类型和数量。
* 使用说明。
* 统计分析计划，考虑到防止产生数据偏差的变化。
* 符合人体受试者保护条例的文件。
* 任何其他相关的方案信息。

未批准和未许可的体外诊断器械的临床研究受“联邦食品药品和化妆品法案” （21 U.S.C. 360j）第520（g）条调查 器械豁免（IDE）规定和实施条例的监管。贵公司应该考虑21 CFR部分812（IDE）如何适用于贵公司的特定研究，并参考21 CFR第50部分（知情同意）和21 CFR第56部分（伦理委员会）其他适用的要求。区分甲型流感亚型和检验新型流感病毒（如甲型流感/ H5）的调查器械需要符合21 CFR 812.3（m）中“重大风险器械”的定义。重大风险器械的临床调查要求根据21 CFR第812部分向FDA提交调查 器械豁免申请进行审查和批准[[7]](#footnote-6)。

对于调查器械区分甲型流感亚型A/H1，A/H3，和A/2009 H1N1，但不是甲型流感A/H5，我们建议临床研究方案规定及时解决甲型流感非亚型结果的方法，包括以下步骤：

* 样本应使用比较法进行检验（按照研究方案），以确认结果为非亚型的。
* 应在培养中传播非亚型病毒之前，谨慎使用实验室标准操作程序。
* 如果使用比较方法确认样本为非亚型，则应立即通知相应的地方、州和/或联邦卫生总局，并遵守其指示。

我们鼓励申办者联系微生物器械部，在研究开始之前对拟议的研究和选择样本类型进行审查。我们特别鼓励制造商在难以获得样本时咨询讨论。

**9.B.ii 研究人群**

我们建议贵公司从患有流感症状疾病（例如咳嗽、鼻塞、鼻漏、喉咙痛、发烧、头痛和肌痛）的个体获取标本进行研究。鼻和气管分泌物中的流感病毒浓度在症状发作后24-48小时仍然很高，并且可能在儿童体内持续时间更长。我们建议在发生流行性感冒症状的三天内收集样本，以获得最佳的检验结果。如果贵公司器械用于筛查个人感染流行性感冒，贵公司应该在研究人群中包括大量有症状和无症状的个体，并且在不流行流感的时间段内进行研究。

我们建议贵公司从每个年龄组中选取代表性的阳性样本（由参考方法确定），并按年龄分层展示数据（例如，出生至5岁的幼儿，6岁至21岁，[14] 22-59岁的成年人，大于60岁的老年人），此外还应列出总体数据汇总表。

**9.B.iii 标本**

贵公司应该在临床研究样本中包括所有标本类型和预期用途所要求的基质（例如鼻药签，鼻咽药签，鼻吸出物）组成的样本，以证明可从每种类型的临床材料获得正确的结果。贵公司应该指明用于收集临床标本的器械（药签，培养液-病毒运送培养基）的类型以及包装说明中所述的性能要求。如果药签没有随器械提供，包装说明书应包含有关商业来源和药签规格（例如尺寸、形状、纤维和轴类型）的信息。不得使用具有木轴或已知抑制流感病毒生长的其他材料的药签。如果建议的病毒运送培养基与临床研究中用于样本的病毒运送培养基不同，或者如果在标签中推荐使用多种病毒运送培养基，则应将提交的病毒运送培养基（例如检测限）的等效性分析研究纳入提交资料。

证实甲型流感、乙型流感或甲型流感的H/N亚型的检验所需的样本总数将取决于病毒的流行程度和检验性能。我们建议所有流行性感冒检验器械显示特异性为95%（双向）置信区间（CI）的下限超过90%。

* 对于检验甲型流感病毒抗原的快速诊断试剂，我们建议贵公司为每种所要求的样本类型提供足够数量的前瞻性收集的样本，以产生敏感的结果，双向95%CI的下限大于60%。通常情况下，我们建议每种样本类型至少检验50个样本，使用参考方法确定为阳性。
* 对于检验乙型流感病毒抗原的快速诊断试剂，我们建议贵公司为每种所要求的标本类型提供足够数量的样本，以产生灵敏的结果，双向95%CI的下限大于55%。通常我们建议每个样本类型至少有30个阳性样本。
* 基于核酸的检验应显示每个分析物至少90%的敏感性，每个样本类型双向95%CI的下限大于80%。

我们建议贵公司评估器械已经顺利登记参加研究的患者身上收集的新鲜标本，检验流感病毒的能力（所有申请者研究）。

冷冻存档标本可以用于分析性能评估，但不推荐用于计算临床敏感性或特异性的研究。冻融可以改变检验预期使用的新鲜样本的特征，可能影响检验性能。然而，对于旨在检验和/或区分难以获得的新鲜样本的流感病毒的器械，可能需要使用例如冷藏的临床标本：

* 根据世界卫生组织（WHO）实验室确诊病例的标准，对于新型流感病毒，贵公司可能需要使用确诊患者的冷冻存档临床标本，以证明贵公司器械的性能[6]。
* 在流感季节，特定类型或亚型流行性感冒异常低的情况下，可以使用已知样本类型的预期收集的标本[[8]](#footnote-7)来补充新鲜的前瞻性采集标本。我们也建议如下：
1. 如果存档标本在冷冻前进行培养，并且培养的结果可用，那么应仅使用调查器械检验标本，并将结果与原始病毒培养结果进行比较。
2. 如果培养的结果不可用，那么应使用可接受的核酸基扩增技术的比较物（例如CDC rRT-PCR流感组）和调查器械解冻并检验存档标本。有关可接受的基于NAAT的比较器械的详细信息和更新，请联系微生物器械部（DMD）。
3. 应进行新鲜-冷冻等效性研究，以证明使用新鲜和冷冻标本的研究，器械的性能等同。

一般来说，当可用于临床检验的样本数量非常少（例如新出现的菌株）时，可能需要通过分析而不是临床研究获得FDA上市前审查的有效证据。在这种情况下，精心设计分析研究尤其重要。动物研究可作为补充分析研究。

如果有限数量的新鲜流感标本可用的话，我们建议贵公司联系微生物器械部讨论备选方案。

**9.B.iv 新鲜样本vs.冷冻样本的评估**

检验流感病毒器械的性能在检验冷冻标本时可能不同于检验新鲜样本。如果新鲜和冷冻标本都包括在临床研究中，贵公司应该评估反复冻融周期对检验性能的影响，并应显示至少95%的阳性一致性，95%（双向） 置信区间超过90%。临床或非天然的标本都可用于本研究。非天然的标本可以通过将培养的病毒掺入适当的阴性临床基质而制备，不同程度的病毒载量包括检验临界值周围的滴度。应至少检验60个代表药签样本的样本和60个代表洗液和抽吸物的样本。

当使用新鲜标本时，培养物中流感病毒的传播是最可靠的。冻融流感病毒可能会降低其活力并产生假阴性结果，特别是在病毒载量低的标本中。如果将这些培养结果用作参考方法，则研究器械的结果可能会有偏倚。如果冷冻标本繁殖，则应证明与新鲜标本的繁殖相比，器械的病毒滴度或性能没有显著下降。传播新鲜和冷冻标本后病毒滴度的比较研究应包括一系列病毒载量的标本，包括检测限周围的滴度。结果应显示至少95%的阳性一致性，95%（双向）置信区间的下限超过90%。

**9.B.v 研究地点**

我们建议贵公司至少在三个不同地理地点收集标本和进行研究，其中一个可以在内部。

我们建议预期用于即时检验或快速检验的器械的性能评估至少一个临床实验室设置一个地点，以及代表该器械预期使用的非实验室设置的地点（例如患者的床边 、 急诊科）。对器械进行检验的临床实验室应配备经验丰富和训练有素的操作者。在非实验室的地点进行检验，该实验室预期使用该器械，但是操作者可能接受较少的实验室培训，这将有助于确定操作者的培训是否会影响器械的性能。

**9.B.vi 参考方法**

我们建议贵公司将器械获得的结果与以下其中的一个或多个已确定的参考方法或比较物获得的结果进行比较。

1. 病毒培养，然后进行直接荧光抗体（DFA）或其他类型特异性抗原检验系统（例如ELISA）。
2. 已经被FDA许可的直接标本荧光检验（DSFA）。使用免疫荧光法（DSFA）的直接标本检验提供比培养更快的特定结果。然而，为了确保最佳的准确性，操作者必须遵循包装说明书上的指导和建议，并通过病毒培养来跟踪所有DSFA阴性标本。

我们建议贵公司确认研究中使用的病毒培养方法遵循CLSI文件M41-A和世界卫生组织“动物流感诊断与监测手册”[5,6]。将样本快速运送到实验室进行最佳病毒恢复或检验至关重要。如果可以使用其他选择，则不应对冷冻标本进行培养，因为冻融会导致病毒感染性丧失。如果在培养细胞中用于病毒检验的荧光抗体是FDA许可的，那么执行检验的实验室只需遵循包装说明书即可，不需要确认信息。如果DFA中使用的抗体是修订前的器械[[9]](#footnote-8)，那么贵公司应该在上市前提交中提供已发表的文献或实验室数据（例如检测限和分析反应性），以验证用于分离自培养物的流感病毒分型的抗体。

如果贵公司的临床方案中包括使用冷冻标本，我们建议贵公司联系FDA的微生物器械部讨论替代方案。

1. 对于核酸基扩增技术（NAAT）的器械，可以使用替代的比较方法，包括直接从临床标本中检验的基于核酸基扩增技术的FDA检验。可接受的比较物是（i）针对每种分析物（例如，甲型，乙型或亚型H1N1，H3N2）证实至少95%的灵敏度（与病毒培养物相比），并且特异性至少为92%，其中甲型为 95%（双向）置信区间的下限超过90%，（ii）不建议或要求对阴性结果进行培养确认。如果贵公司器械的性能与可接受的比较检验法相比，那么贵公司应该将结果计算为阳性一致性百分比和阴性一致性百分比（而不是灵敏度和特异性）。临床性能应符合以下标准：阳性阴性百分比至少为95%，95%（双向）CI下限超过90%。随着流感病毒继续突变并抗原性漂移，比较器械的性能也可能随时间而变化。我们建议贵公司联系DMD获取目前可接受的比较物分析清单。
2. FDA批准的检验或表征的抗体不可用时，我们建议使用已验证的聚合酶链反应（PCR），然后对红细胞凝集素（HA）或其他亚型特异性靶标扩增子进行双向测序，以鉴定甲型流感病毒亚型。这种替代方法对于培养细胞或样本中的亚型病毒是可用的，这些培养细胞或样本确定为甲型流感阳性的培养基或者核酸基扩增技术比较物。如果贵公司的检验基于核酸扩增技术，非FDA许可的比较PCR的引物序列应与贵公司器械中包含的引物序列不同，并且应确认比较试验。

贵公司应该提供已发表的文献或实验室数据，以支持用于区分甲型流感亚型的PCR确认。确认应包括检测限和分析反应性数据。该PCR的检测限应与器械的分析灵敏度相似。如果测序作为甲型流感病毒分化比较方法的一个组成部分，我们建议贵公司对扩增子的两条链进行测序反应（双向测序），生成的序列符合以下的验收标准：

* 序列应至少包含100个连续的碱基。
* 基数应由PHRED测量质量值为20或更高，应用Biosystems KB Basecaller或类似的软件包（代表1%或更低的误差概率）[15]。
* 序列应将参考或共有序列与特异性靶标的预期值（E值）<10-30相匹配（对于BLAST，搜索GenBank，http：//www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank /）。

此外，如果公共卫生总局建议不要获取怀疑感染新型流感病毒的患者的标本，我们建议贵公司使用经FDA批准的NAAT器械或经过确认的PCR检验，然后测序扩增子来确认新病毒的类型。

**9.C 上市后性能确认**

我们建议贵公司获取和分析上市后的数据，以确保器械的持续可靠性，特别是考虑到流感病毒变异的倾向以及病毒应变流行率随时间的变化。根据21 CFR 820.100（a）（1），纠正和预防措施的要求，“贵公司必须分析流程...投诉，退回产品和其他质量数据来源，以确定不合格产品或其他质量问题的现有和潜在原因。目前可以获得更新的流感病毒序列（来自世界卫生组织，美国国立卫生研究院和其他公共卫生实体），贵公司应该继续监测检验的性能。此外，根据21 CFR 820.30（g）设计确认，这些分析应评估器械的设计确认和风险分析，以确定是否需要进行设计更改。贵公司的上市后监管的目的应该是确保贵公司的器械保持其规定的性能水平，尽管流感病毒具有抗原性漂移。

**9.D CLIA豁免**

如果贵公司根据1988年临床实验室改进修订建议书（CLIA）[[[10]](#footnote-9)](#bookmark9" \o "Current Document)对器械进行豁免分类，我们建议贵公司咨询微生物学器械部的工作人员，了解具体研究的设计，以支持贵公司器械的CLIA豁免申请。也提供“1988年临床实验室改进修订建议书（CLIA）豁免申请书”指南文件[16]。

**9.E 基于核酸的流感试剂**

该处信息与预期确定核酸基的流感检验性能的研究相关[17,18]。本部分补充本文件前面介绍的性能研究建议。在适用的情况下，贵公司应该制定设计控制规范，避免或降低用于检验病毒RNA片段的引物、探针和控制相关风险，如以下例子：

* 防止在制造过程中处理许多探针的多重检验中的探针的交叉污染。
* 最小化由于样本的污染或剩余造成的误报。
* 将多个探针用于单个分析物，以检验由于靶标RNA区段内的突变或指定的流感病毒株（或谱系）内的变体而出现的病毒变体。
* 开发或推荐确认的核酸提取和纯化方法，产生合适质量和数量的病毒核酸，用于使用贵公司试剂的检验系统。

**9.E.i 核酸提取**

不同的提取方法可以产生不同数量和质量的核酸，因此，提取方法对成功的结果至关重要。病毒核酸的纯化具有挑战性，因为微生物样本可能含有由人类基因组DNA背景掩蔽的低病毒滴度，以及高水平的蛋白质和其他污染物。

基于以上原因，贵公司应该评估所选择的提取方法对于检验的性能的影响。如果包含或推荐多种提取方法参与检验，贵公司应该证明提取的质量和有效性，并进行每种提取方法的检验分析和临床性能评估。具体来说，贵公司应该证明器械的每种预分析方法的检出限和可重复性。贵公司可将提取方法的变量与每个地点性能的变量组合。例如，如果贵公司推荐三种不同的提取方法，贵公司可通过在三个检验地点评估三种提取方法中的一种来设计重现性研究：地点1的检验提取方法A，地点2的检验提取方法B和地点3的检验提取方法C。然而，如果来自三个地点的研究表明在检验性能方面具有统计学或临床上的显著差异，则应该扩大重现性研究以包括在三个研究地点检验每种提取方法（例如，地点1提取方法A，B和C，地点2提取方法A，B和C，以及地点3提取方法A，B和C）。

除了分析研究（外部位点的检验限和重现性）之外，在临床研究期间应当在至少一个临床地点处利用每种提取方法来产生临床性能数据。如果扩增的重现性检验的结果表明提取方法之间的有效性有显著差异，那么来自每个临床检验地点（使用不同的核酸提取方法）的数据不能被认为是等同的，也不能组合，而应分别进行分析。因此，可能需要额外的预期临床样本来支持声明的提取方法。

**9.E.ii 核酸基的流感检验的对照**

我们建议贵公司在分析和临床研究中使用质量对照材料来验证检验的性能。如果贵公司的器械基于核酸技术，我们通常建议贵公司包括以下类型的对照：

*阴性对照*

*空白或无模板对照*

空白或无模板对照，包含缓冲液或样本运输培养基和除核酸以外的所有检验组分。这些对照用于排除靶核酸的污染或扩增反应中增加的背景。在单次检验一次性试剂盒或管中可能不需要。

*阴性样本对照*

阴性样本对照包含非靶核酸，或者如果用于评估提取程序，则其包含整个非靶微生物。用来揭示非特异性启动或检验，并表明在不存在靶序列的情况下不获得信号。可接受的阴性样本对照材料例如包括：

* 来自非流感感染个体的患者标本。
* 含有非靶标微生物（例如感染非流感病毒的细胞系）的样本。
* 替代阴性对照，例如外源包膜RNA [19]。

*阳性对照*

*完整检验的阳性对照*

阳性对照包含靶核酸，并用于对照整个检验过程，包括RNA提取、扩增和检验。被设计用来模拟患者标本，并以与实验室质量体系（QS）确定的频率同时与患者的标本同时运行。可接受的阳性检验对照材料例如包括：

* 感染灭活或非毒性流感病毒株的细胞系。
* 包装的流感RNA。

*阳性对照的扩增/检验*

用于扩增/检验的阳性对照包含在定性检验的检验极限或接近极限的纯化靶核酸。获得阴性结果时，对照患者样本和反应组分的完整性。表明如果样本中存在靶标的话，则会检验到。

*内对照*

内对照是与靶标核酸共萃取和共扩增的非靶标核酸序列。其确保试剂的完整性（聚合酶，引物等），器械功能（热循环仪）和样本中抑制剂的存在。这种类型的对照也可以确保样本的充足性或人体细胞材料的采样（宿主靶标）。可接受的内对照材料例如包括与流感病毒共同提取的MS2噬菌体或人类核酸，和扩增人类管家基因（例如RNaseP，P-肌动蛋白）的引物。

1. **参考文件**
2. II类特殊控制指导性文件：临床多重检验系统的仪器http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments / ucm077819.htm
3. 医疗器械中软件的上市前提交内容指南http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments / ucm089543.htm
4. 临床和实验室标准研究所。2001。传染病免疫检验规范；批准指南，第二版。ILA18-A2。
5. 临床和实验室标准研究所。2004。“确定检验限和定量限的方案” 批准指南。EP17-A。
6. 临床和实验室标准研究所。病毒培养；批准指南。M41-A。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。
7. 世界卫生组织动物流感诊断与监测手册。2002年，日内瓦（世界卫生组织）。（完整文件WHO / CDS / CSR / NCS / 2002.5，获取网址：http：//www.wpro.who.int/NR/rdonlyres/EFD2B9A7-2265-4AD0-BC98-97937B4FA83C / 0 / manualonanimalaidiagnosisandsurveillance.pdf
8. 疾病控制和预防中心。2006年7月。流感疫苗组成，“MMWR建议和报告：预防和控制流感：免疫工作咨询委员会的建议”（ACIP）。7月28日； 55（RR10）：1-42。www.cdc.gov/flu/professionals/vaccination/composition0607.htm
9. 临床和实验室标准研究所。2005年。临床化学中的干扰检验；批准指南。EP7-A2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。
10. 临床和实验室标准研究所。1995年。使用受试者工作特征曲线（ROC）评估实验室检验的临床精确度；批准指南。GP10-A。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。
11. 临床和实验室标准研究所。2004年。定量测量方法精确度性能评估。批准指南。EP5-2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。
12. 临床与实验室标准研究所。2002年。用于定性检验性能评估的用户方案；批准指南。EP12-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。2006年。用户对精确度性能和真实性的验证；批准指南。EP15-A2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。
14. Haeckel R.（1991）“临床化学中后续效应的说明与测量方案”。纯应用化学。63：302-306。
15. 行业和FDA工作人员指南：儿科医疗器械的上市前评估。2004年。[http：//www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/](http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/) GuidanceDocuments / ucm089742.pdf
16. Patton，S.J.，Wallace，A.J.，Elles，R。（2006）评估DNA测序质量的基准：国际外部质量评估计划的提案。临床化学，52：728-736。
17. 行业和FDA工作人员指南：1988年临床实验室改进修订建议书（CLIA）体外诊断器械制造商豁免申请。2008年。[http：//www.fda.gOv/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments / ucm070890.pdf](http://www.fda.gOv/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments%20/%20ucm070890.pdf)
18. 临床与实验室标准研究所。核酸测序方法在诊断实验室医学的应用；批准指南。MM9-A。临床和实验室标准研究所，Wayne PA。
19. 临床和实验室标准研究所。2006。传染病分子诊断方法；方案指南。MM3-A2。临床和实验室标准研究所，Wayne PA
20. Pasloske BL，Walkerpeach CR，Obermoeller RD，Winkler M和DuBois DB。（1998）用于生产耐核糖核酸酶病毒RNA对照和标准品的Armored RNA技术。临床微生物学杂志，36：3590-3594。



1. 有三种类型的流感病毒：A，B和C。甲型流感病毒基于两种主要表面糖蛋白，红细胞凝集素（HA）和神经氨酸苷酶（NA），进一步分类为亚型。 流行性感冒A亚型和B型病毒进一步按菌株分类（http://www.cdc.gov/flu/avian/gen-info/flu-viruses.htm）。 [↑](#footnote-ref-0)
2. 将检验设计在患者的所在地或者附近，不需要永久的专用空间，在临床实验室外需设立物理设施http://www.cap.org/apps/cap .portal [↑](#footnote-ref-1)
3. 在预期用途人群中感染的受试者身上发现典型病毒浓度的样本。 [↑](#footnote-ref-2)
4. 空白限定义为在不含分析物的样本中一系列结果的最高预期值，或者可靠观察到的大于零的最低检验结果。 [↑](#footnote-ref-3)
5. I型误差是真实阴性样本（零分析物浓度）产生指示分析物存在的值的概率。 通常，Type I误差设置为5％或更少。 [↑](#footnote-ref-4)
6. 将新的检验器械的性能与已建立的参考方法进行比较，无论是否是原始数据，创建一个评估该器械的参考框架。在上市前通告和实质等同性评估的情况下，分类或与比较器械的性能进行比较。 [↑](#footnote-ref-5)
7. 7贵司还可以参考“伦理委员会、临床调查员和申办方信息表指南”，网址：http://www.fda.gov/oc/ohrt/irbs/devrisk.pdf，和“关于使用单独非识别的剩余人体标本进行体外诊断试剂研究的知情同意指南” ，网址:http://www.fda.gov/downloads/RegulatoryInformation/Guidances/ucm127033.pdf。 [↑](#footnote-ref-6)
8. 针对本指南，从符合研究纳入标准的所有患者顺序收集预期存档标本，代表检验预期用途人群（即，未预选已知结果的样本）在两个预定日期（例如，从流感季节的开始到结束）入组临床检验，所以没有偏倚，保留患病率。 这些标本应该在适当条件下储存（例如，在-70℃冷冻）。 [↑](#footnote-ref-7)
9. 修订前的器械是1976年5月28日之前（1976年制定医疗器械修正案的日期）引入或交付用于商业分销的国家商业用途的器械。 [↑](#footnote-ref-8)
10. 请参阅42 U.S.C. § 263a(d)(3). [↑](#footnote-ref-9)