

肠道病毒核酸检测试剂注册技术审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对肠道病毒核酸检测试剂注册申报资料的准备及撰写，同时也为技术审评部门审评注册申报资料提供参考。

本指导原则是针对肠道病毒核酸检测试剂的一般要求，申请人应依据产品的具体特性确定其中内容是否适用，若不适用，需具体阐述理由及相应的科学依据，并依据产品的具体特性对注册申报资料的内容进行充实和细化。

本指导原则是供申请人和审查人员使用的指导性文件，不涉及注册审批等行政事项，亦不作为法规强制执行，如有能够满足法规要求的其他方法，也可以采用，但应提供详细的研究资料和验证资料。应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则。

本指导原则是在现行法规、标准体系及当前认知水平下制定的，随着法规、标准的不断完善和科学技术的不断发展，本指导原则相关内容也将适时进行调整。

一、范围

（一）肠道病毒简介

肠道病毒属于小 RNA 病毒科肠道病毒属，能引起人类致病的肠道病毒有多种，包括人肠道病毒 A、B、C、D 组，有 100 多个血清型。人类肠道病毒主要包括：脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒 A 组 (Coxsackievirus A, CA)、柯萨奇病毒 B 组 (Coxsackievirus B, CB)、人肠道致细胞病变孤儿病毒 (简称埃可病毒) (Echovirus

ECHO)、新肠道病毒等。新肠道病毒为 1969 年后陆续分离到的，例如新型肠道病毒 71 型(EV71)等。近年来，鼻病毒(Rhinovirus)被划入肠道病毒属，鼻病毒包括 A、B、C 组，已经先后分离得到 140 多个血清型。

肠道病毒为球形，直径 28~30nm，核衣壳二十面体立体对称，无包膜。病毒衣壳由 60 个相同的壳粒组成，排列为 12 个五聚体，每个壳粒由 VP1、VP2、VP3 和 VP4 四种蛋白组成。

肠道病毒基因组为单股正链 RNA，全长约为 7.2~8.4kb，基因组分为三部分，两端为保守的非编码区，在肠道病毒中同源性非常显著，其中 5' 端非编码区常作为肠道病毒通用检测试剂检测的靶基因。中间为连续开放读码框，包含结构蛋白编码区和非结构蛋白编码区，结构蛋白编码区依次编码 VP4、VP2、VP3 和 VP1 共 4 个衣壳蛋白。衣壳蛋白不仅含有抗原决定位点，而且还有决定病毒组织嗜性的受体识别位点，介导病毒与细胞的吸附和进入。非结构蛋白编码区主要负责编码与病毒基因组复制以及病毒颗粒包装等有关的蛋白及酶，它们在 RNA 复制、细胞器修饰，细胞裂解及形态形成中发挥各自不同的功能。

(二) 肠道病毒致病性

肠道病毒在肠道中增殖，但通常不引起肠道疾病。90% 以上肠道病毒感染为隐性感染，或仅出现轻微的上呼吸道感染或流感样症状。不同肠道病毒可以引起相同的临床症状，同一种病毒可引起几种不同的临床疾病。

肠道病毒的传染源为患者和无症状的病毒携带者。传播途径主要是粪-口途径，也可通过呼吸道传播，夏秋季是一年之中的

主要流行期。肠道病毒以上呼吸道、咽喉和肠道为侵入门户，先在局部黏膜和咽、扁桃体等淋巴组织和肠道集合淋巴结中初步增殖，然后释放入血，形成第一次病毒血症。扩散至带有受体的靶组织，再次增殖后，引起第二次病毒血症和临床症状。脊髓灰质炎病毒识别的受体为免疫球蛋白超家族的细胞黏附分子，只有很少的组织表达这种受体，如脊髓前角质细胞、被根神经节细胞、运动神经元、骨骼肌细胞和淋巴细胞等，柯萨奇病毒和埃可病毒识别的受体在组织和细胞中分布广泛，包括中枢神经系统、心、肺、胰、黏膜、皮肤和其他系统等，因而引起的疾病谱复杂，大多数肠道病毒为杀细胞病毒、直接对靶细胞产生裂解性感染。各年龄段人群均可感染肠道病毒。

肠道病毒所致的主要疾病有：

1.手足口病：由肠道病毒感染而引起，以发热，咽喉痛，全身不适，手、足、口腔等部位皮疹或疱疹为主要特征的常见传染病，大多数手足口病患者症状轻微，并且具有自限性，但有相当一部分患者有致死性心肺功能疾病和神经系统并发症，个别重症患者病情进展迅速，甚至可导致死亡。我国手足口病疫情尤为严峻，其已成为严重影响我国居民生命和健康的公共卫生问题。

手足口病致病病原体传染源为患者或隐性感染者，主要的传播途径为粪-口传播，也可经接触患者的疱疹液传播，接触病人和携带者的粪便、唾液和疱疹液污染的日常生活用品均可传播此病原体，近年来的报道显示，该病原体也可垂直传播，导致新生儿重症感染。人对肠道病毒普遍易感，不同年龄组均可感染发病，以5岁以下儿童为主，尤以3岁以下儿童发病率最高，该病流行

无明显的地区性，全年均可发生，一般 5—7 月为发病高峰。该病的潜伏期一般为 2—10 天，平均潜伏期为 3—5 天，感染者发病前的数天即可从其咽拭子样本和粪便样本中检出病毒，病程为 7 天左右，咽部排毒可持续在发病后 1—2 周，而粪便排毒可持续至发病后 3—5 周。

引起手足口病的肠道病毒包括柯萨奇病毒 A 组的 2、4、5、6、7、9、10、16 型等，B 组的 1、2、3、4、5 型等，肠道病毒 71 型及埃可病毒等，其中以 EV71 和 CA16 型较为常见。

2. 无菌性脑膜炎：肠道病毒感染引起的一种疾病，常表现为短暂发热、头痛等，偶尔有肌肉酸痛，或伴有皮疹，重者出现颈项强直、嗜睡、昏迷、意识障碍、脑膜刺激征等症状。目前发现肠道病毒中有 60 多个血清型能引起无菌性脑膜炎，包括脊髓灰质炎病毒所有型别、柯萨奇病毒 A 组中的大多数型别、柯萨奇病毒 B 组的 1—6 型、埃可病毒大多数型别和肠道病毒 71 型等。

3. 脊髓灰质炎：是由脊髓灰质炎病毒感染而引起的疾病，其中 85% 由 I 型脊髓灰质炎病毒引起，在我国曾有由 II、III 型病毒感染而发病的病例。病毒侵犯脊髓前角运动神经细胞，导致弛缓性肢体麻痹，多见于儿童，故亦称小儿麻痹症。

4. 疱疹性咽峡炎：主要由柯萨奇病毒 A 组某些血清型引起，典型的症状是在软腭、悬雍垂周围出现水泡性溃疡损伤。

5. 流行性胸痛：常由柯萨奇病毒 B 组引起，症状为突发性发热和单侧胸痛。

6. 心肌炎和心包炎：主要由柯萨奇病毒 B 组引起。在婴儿室可引起暴发性流行，死亡率高。散发流行于成人和儿童。

7.眼病：由柯萨奇病毒 A 组 24v 型引起急性结膜炎和 EV-D-70 型引起的急性出血性结膜炎。

此外，肠道病毒感染可能还与病毒感染后疲劳综合征、糖尿病相关。

（三）本指导原则适用范围

1.本指导原则适用于利用荧光探针聚合酶链式反应（Real-time PCR）或其他类分子生物学方法，以特定的肠道病毒基因序列为检测目标，对来源于人体样本中的肠道病毒核酸进行体外定性检测，临床用于辅助诊断手足口病等肠道病毒感染相关性疾病。涉及其他临床用途的肠道病毒核酸检测试剂可参考本指导原则。手足口病致病病原体中未包含鼻病毒，因此，鼻病毒不在本指南的讨论范围内。

2.临床用于检测手足口病致病病原体的检测试剂，适用样本类型应为鼻咽拭子、咽拭子、粪便/肛拭子、疱疹液、脑脊液（仅限出现神经系统症状的病例）、血液等。

3.本指导原则适用于肠道病毒通用核酸检测试剂、单一病毒种检测试剂及单一病毒血清型检测试剂。通用检测试剂所检病毒型别应至少包括柯萨奇病毒 A 组的 2、4、5、6、7、9、10、12、16 型等，B 组的 1、2、3、4、5 型等，肠道病毒 71 型及埃可病毒等；针对柯萨奇病毒核酸检测试剂所检病毒型别应至少包括上述 A 组与 B 组中的血清型；针对柯萨奇 A 组或 B 组核酸检测试剂所检病毒型别应至少包括上述该组所列血清型。针对埃可病毒核酸检测试剂所检病毒型别应至少涵盖埃可病毒 3、6、11、14、16、19、25、30 等血清型。

二、注册申报资料要求

（一）综述资料

综述资料主要包括产品预期用途、产品描述、有关生物安全性的说明、有关产品主要研究结果的总结和评价以及其他等内容，其中，与预期用途相关的临床适应症应重点描述申报产品所检测的肠道病毒型别与临床适应症的相关性及相关肠道病毒在我国的流行特征；产品描述应明确申报产品所有可检出的肠道病毒型别、尚未验证的肠道病毒型别；同类产品在国内外批准上市的情况，应着重从所检病毒型别、不同型别检测的最低检测限及不同型别间的交叉反应等方面写明拟申报产品与目前市场上已获批准的同类产品之间的主要区别。综述资料的撰写应符合《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理总局令第5号）和《关于公布体外诊断试剂注册申报资料要求和批准证明文件格式的公告》（国家食品药品监督管理总局公告2014年第44号）的相关要求。

（二）主要原材料研究资料

此类产品的主要原材料包括引物、探针、DNA 聚合酶、dNTP、逆转录酶、尿嘧啶 DNA 糖基化酶（如适用）、核酸分离/纯化组分（如有）、试剂盒质控品及企业参考品等。应提供主要原材料的选择与来源、制备及质量标准等的研究资料、质控品的确认试验资料；生产企业还应提供企业参考品的原材料选择、来源、质量指标、参考品的制备及阴阳性的确认过程等。

1.引物和探针：包括申报产品检测靶序列的引物和探针以及内对照的引物和探针。应详述引物和探针的设计原则，提供引物、

探针核酸序列、模板核酸序列及两者的对应情况。针对检测靶序列的引物和探针，建议设计两套或多套引物、探针以供筛选，针对所有预期适用的肠道病毒型别进行检出准确性和特异性（如交叉反应）的评价，可采用扩增靶序列与所有型别肠道病毒基因组比对研究的方法，最终确认最佳组合，并提交筛选的研究数据。引物、探针的质量标准应至少包括序列准确性、纯度检查、浓度检查及功能性实验等。

2.酶：需要的酶主要包括逆转录酶、DNA 聚合酶，其质量标准如下：

2.1 逆转录酶应包括核酸逆转录活性、无核酸内切酶活性等。

2.2 DNA 聚合酶应包括 DNA 聚合酶活性、无核酸内切酶活性、热启动能力、热稳定性等。

2.3 如申报产品中包含尿嘧啶 DNA 糖基化酶，应对其酶活性及热稳定性等质量控制标准进行规定。

3.dNTP：质量标准应至少包括纯度检查及功能性实验等。

4.核酸分离/纯化组分（如有）的原理介绍、主要组成、主要原材料的质量控制标准及相关验证资料。

5.试剂盒质控品

试剂盒的质控体系通过设置各种试剂盒质控品来实现，针对阳性质控品和阴性质控品申请人应明确质控品的来源、质量标准、质控品阴阳性的确认方法及相关验证资料。申报产品的质控体系应考虑以下几个方面：

5.1 阳性质控品中应含有天然的或人工合成的包含试剂盒所检测靶序列的 RNA，至少应包含临床较常见的血清型。质控品

应参与样本处理和检测的全过程，如核酸的平行提取等步骤。企业应对质控品的检测结果（如 Ct 值）做出明确的范围要求。

5.2 阴性质控品应不含试剂盒所检测靶序列的 RNA，质控品应参与样本处理和检测的全过程，如核酸的平行提取等步骤，以对可能存在的交叉污染产生的假阳性结果进行质量控制。

5.3 内对照（内标）可以对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制，申请人应对内对照（内标）的引物、探针设计和模板浓度做精确验证，既要保证内标荧光通道呈明显的阳性曲线又要尽量降低对靶基因检测造成的抑制。对内对照的检测结果（如 Ct 值）亦应做出明确的范围要求。

6.企业参考品：应详细说明有关企业参考品的原料选择、制备、阴阳性确认等试验。

企业参考品的核酸性质应与产品预期检测的靶物质一致。鉴于肠道病毒为 RNA 病毒，企业参考品可采用灭活病毒、含有肠道病毒基因组的装甲病毒（或假病毒）、人工克隆或合成的肠道病毒基因组 RNA。具体要求如下：

6.1 阳性参考品和阴性参考品

阳性参考品应包含本指南范围中规定申报产品至少应检出的肠道病毒血清型，例如，肠道病毒通用型检测试剂阳性参考品应至少包含柯萨奇病毒 A 组的 2、4、5、6、7、9、10、12、16 型等，B 组的 1、2、3、4、5 型等，肠道病毒 71 型及埃可病毒等，其他单一病毒种及单一病毒血清型检测试剂阳性参考品应包含该类产品至少应检出的血清型。阴性参考品应考虑检测特异性的评价，应纳入不在试剂盒检测范围内的其他肠道病毒血清型样

品（如有）和其他病原体样品。

6.2 检测限参考品

申请人应明确检测限参考品中病毒核酸浓度的确定方法，明确检测限参考品中病毒核酸浓度的确定依据，检测限参考品中肠道病毒核酸浓度应为申报产品检测限浓度或略高于检测限浓度，检测限参考品应包含申报产品至少应检出的肠道病毒血清型。

6.3 精密度参考品

可不包含所有涉及的肠道病毒血清型，但应选择多个临床较常见的型别，针对所选型别应分别至少设置一个弱阳性水平。

若主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定，并提交生产工艺验证报告；如主要原材料购自其他供应商，则需针对供应商的选择提供评价数据，并提供供应商出具的质量标准、出厂检定报告以及申请人对该原材料进行的质量检验资料。

（三）主要生产工艺及反应体系的研究资料

1.介绍产品主要生产工艺，可以图表方式表示，并说明主要生产工艺的确定依据。

2.反应原理介绍。

3.详述样本采集、样本处理方式的选择和设置，提供相关的研究资料。

4.确定最佳反应体系的研究资料，包括样本用量、各种酶浓度、引物/探针浓度、dNTP 浓度、阳离子浓度及反应各阶段温度、时间、循环数等。

5.不同适用机型的反应条件如果有差异应分别详述，并提交验证资料。

6.如申报产品包含核酸分离/纯化试剂，应提交对核酸分离/纯化过程进行工艺优化的研究资料。

（四）分析性能评估资料

申请人应提交产品研制阶段对试剂盒进行的所有性能评价的研究资料，对于每项分析性能的评价都应包括具体研究目的、试验方法、可接受标准、试验数据、统计方法等详细资料。有关分析性能验证的背景信息也应在申报资料中有所体现，包括实验地点、适用仪器、试剂规格、批号、临床样本来源等。

针对不同的样本类型，申请人应分别完成性能评估，包括阴阳性符合率、最低检测限、精密度、分析特异性等。

分析性能评价的试验方法可以参考国际或国内有关体外诊断试剂性能评估的指导原则进行。对于此类产品，性能评估中所用样品（除非特别说明）可参考上述企业参考品的制备要求。各项性能评价应符合以下要求。

1.核酸分离/纯化性能

在进行靶核酸检测前，应有适当的核酸分离/纯化步骤。该步骤的目的除最大量分离出目的核酸外，还应有相应的纯化作用，尽可能去除 PCR 抑制物。无论检测试剂是否含有核酸分离/纯化的组分，企业都应结合检测试剂的特性，对配合使用的核酸分离/纯化试剂的提取效率、提取核酸纯度等做充分的验证，提供详细的验证资料。

2.申请人应明确申报产品所能检出所有肠道病毒血清型及不能检出的血清型。建议申请人采用申报产品对目前已知所有肠道病毒血清型样本进行检测，以验证申报产品所检血清型范围，

用于验证的样本可以为临床收集样本、病毒基因组或人工构建假病毒。

3.阳性/阴性参考品符合率

阳性参考品的检测旨在验证试剂盒检测范围内的各肠道病毒血清型均可以在适当的浓度被检测到，阳性参考品检测结果应为阳性。阴性参考品旨在评价试剂特异性，阴性参考品检测结果应为阴性。

4.最低检测限

申报产品最低检测限的性能评估资料应包含最低检测限的确定及验证过程。

4.1 应针对申报产品所能检出的 CA16、CA6、EV71 等常见肠道病毒血清型分别进行确定，建议采用培养后病毒原液进行梯度稀释，配制系列稀释的样品进行最低检测限的评价，系列稀释度应能够覆盖大部分检出概率区间（0~100%），可通过概率计算或其他适当方法进行测算选取适当检出率水平的浓度作为最低检测限确定的标准，如 95%（ $n \geq 20$ ）的阳性检出率水平。病毒原液浓度测定建议采用空斑试验，浓度水平采用空斑形成单位（PFU）为计量单位。

4.2 应选择申报产品最低检测限或接近最低检测限的病毒水平对申报产品最低检测限进行验证，验证最低检测限的样本应至少包含申报产品所能检出的 CA16、CA6、EV71 等常见肠道病毒血清型，应至少选择多个病毒株进行验证。企业应能够提供用于最低检测限验证的各个病毒株的来源、型别及浓度水平（PFU）确认试验等信息。

4.3 申请人应明确申报产品最低可检出的肠道病毒基因拷贝数水平，同时提供确定过程及相关实验数据，本项研究应针对不同血清型分别确认，所用样本血清型应包括申报产品最低检测限参考品设置的血清型。

4.4 申报产品检测企业最低检测限参考品，检测结果应满足相应要求。

5.分析特异性

5.1 交叉反应

申请人应针对可能出现在检测样本中的病原体进行交叉反应验证，用于交叉反应验证的样品，除肠道病毒外，其他病原体应尽量采用灭活病原体培养物或临床样本。建议在病毒和细菌感染的医学相关水平进行交叉反应的验证，申请人应详细说明交叉反应样本来源、病原体鉴定和滴度确定的方法和结果。病原体种类主要考虑以下几方面：试剂盒检测范围以外的其他肠道病毒血清型、样本中可能出现的其他病原体。建议对以下病原体进行交叉反应验证：诺如病毒、单纯疱疹病毒 1/2 型、肠道腺病毒、水痘-带状疱疹病毒、轮状病毒、甲型肝炎病毒、星状病毒、EB 病毒、风疹病毒、麻疹病毒、甲型流感病毒、副流感病毒、乙型流感病毒、巨细胞病毒、呼吸道合胞病毒、流行性腮腺炎病毒、戊肝病毒、B 族链球菌、肺炎克雷伯菌、大肠杆菌、脑膜炎奈瑟菌、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺菌、弧菌、流感嗜血杆菌、卡他莫拉菌、草绿色链球菌、奈瑟菌属、黏液罗氏菌、变形杆菌等。

5.2 干扰试验

应根据所采集样本类型，针对可能存在的干扰情况进行验证。建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度（“最差条件”）条件下进行评价，并针对有代表性的肠道病毒血清型，至少在病毒临界阳性水平进行干扰试验验证。干扰物质的选取应至少包括：血红蛋白、黄疸（仅限血液样本）、脂血（仅限血液样本）、白细胞、粘蛋白、常见病毒治疗药物、抗生素、微生态制剂、粪便中未消化的食物纤维等。

6. 精密度

企业应对申报产品精密度指标，如标准差或变异系数等的评价标准做出合理要求。因模拟样本并不能体现临床样本可能带来的所有变异因素，因此精密度评价中所用样本应至少包含精密度参考品及若干临床样本，且精密度评价试验应包含核酸分离/纯化步骤。针对本类产品的精密度评价主要包括以下要求：

6.1 对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除检测试剂（包括核酸分离/纯化组分）本身的影响外，还应对分析仪、操作者、试验地点、检测批次等要素进行相关的验证。

6.2 设定合理的精密度评价周期，例如：为期至少 20 天的检测，每天至少由 2 人完成不少于 2 次的完整检测，从而对批内/批间、日内/日间以及不同操作者之间的精密度进行综合评价。

6.3 用于精密度评价的临床样本均应至少包含 3 个水平：阴性样品、临界阳性样品、（中或强）阳性样品，并根据产品特性设定适当的精密度要求，临床样本精密度评价中的每一次检测均应从核酸提取开始。

（五）阳性判断值确定资料

对于此类试剂，阳性判断值即为能够获得理想的临床灵敏度和临床特异性的临界值（Cutoff），对于荧光探针 PCR 方法即为 Ct 值的确定资料。建议采用受试者工作特征（ROC）曲线的方式进行相关研究。申请人可选取适当的临床样本进行试验以确定阳性判断值。

（六）稳定性研究资料

稳定性研究资料主要涉及两部分内容，申报试剂的稳定性和适用样本的稳定性研究。前者主要包括实时稳定性（有效期）、开瓶稳定性及冻融次数限制等研究，申请人可根据实际需要选择合理的稳定性研究方案。稳定性研究资料应包括研究方法的确定依据、具体的实施方案、详细的研究数据以及结论。对于实时稳定性研究，应提供至少三批样品在实际储存条件下保存至成品有效期后的研究资料。

考虑到病毒 RNA 极易被降解的特性，企业也应对样本稳定性进行研究，主要包括冷藏和冷冻两种条件下的有效期验证，可以在合理的温度范围内，每间隔一定的时间段即对储存样本进行全性能的分析验证，从而确认不同类型样本的效期稳定性。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

对于样本提取后不能立即进行检测的，应明确核酸储存条件、储存时间等，同时应提供相应的核酸稳定性研究资料。

试剂稳定性和样本稳定性两部分内容的研究结果均应在说明书【储存条件及有效期】和【样本要求】两项中进行详细说明。

（七）临床试验

临床试验的开展、方案的制定以及报告的撰写等均应符合相关法规及《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》（国家食品药

品监督管理局通告 2014 年第 16 号) 的要求。

1. 研究方法

对于已有同类产品上市的试剂的临床研究, 选择境内已批准上市、临床普遍认为质量较好的同类产品作为参比试剂, 采用拟申报产品(以下称考核试剂)与之进行对比试验研究, 证明本品与已上市产品等效或优于已上市产品。另外, 申请人还应选择不少于 30 例核酸检测阳性的新鲜采集样本进行考核试剂与肠道病毒感染检测的“金标准”方法—病毒分离培养鉴定方法或其他证明肠道病毒感染的方法进行比较研究。如医院无病毒培养条件, 可由该医院委托其他具有相应条件的机构进行。

对于无法选择参比试剂的新型肠道病毒核酸测试剂, 其临床研究应选择病毒分离培养鉴定和/或病毒核酸序列测定方法作为参比方法。用于核酸序列测定的引物序列应不同于考核试剂中用于检测目的基因的引物序列。

临床试验中如涉及核酸序列测定方法, 则建议对扩增子进行双向测序。应在临床研究报告中对选用的测序方法做详细介绍, 并提供以下关于测序试验的详细信息及资料:

1.1 测序方法原理、测序仪型号、测序试剂及消耗品的相关信息。

1.2 测序方法所用引物相关信息, 如基因区段选择、分子量、纯度、功能性试验等资料。

1.3 对所选测序方法的分析性能进行合理验证, 尤其是最低检测限的确认, 建议将所选测序方法与拟申报产品的相关性能进行适当比对分析。

1.4 测序方法应建立合理的阳性质控品和阴性质控品对临床样本的检测结果进行质量控制。

1.5 提交有代表性的样本测序图谱及结果分析资料。

2. 临床试验病例数

申报产品临床试验总病例数应不低于 500 例。入组样本的血清型应满足如下要求，肠道病毒通用型检测试剂阳性样本应至少包含柯萨奇病毒 A 组的 2、4、5、6、10、12、16 型等，B 组的 1、2、3、4、5 型等，肠道病毒 71 型及埃可病毒等，其他单一病毒种及单一病毒血清型检测试剂阳性样本应包含该产品至少应检出的血清型；上述血清型中常见血清型应包括该型别中不同的基因型，常见血清型阳性病例数单独统计应满足统计学要求。单一病毒血清型检测试剂，临床试验中其检测的血清型应包括该型别中不同的基因型，阳性病例数应满足统计学要求。

另外，对于已被批准上市的肠道病毒核酸（通用型）检测试剂，如果在其注册证有效期内出现了新型肠道病毒的暴发流行，如有需要，生产企业应迅速针对新型肠道病毒开展临床比对研究，可以采用病毒检测的“金标准”方法或当时卫生行政部门认可的针对该新型肠道病毒血清型的诊断标准作为参比方法进行临床比对研究，分别对采集自新型肠道病毒感染（阳性病例不少于 30 例）、其他常见的肠道病毒及非肠道病毒感染但具有相应症状的患者的新鲜样本进行比对实验研究，总例数不少于 200 例，如临床试验研究结果可以证明其对新型肠道病毒的检测能力，申请人应考虑产品预期用途发生的改变，同时提出变更申请，并按相关法规要求提交分析性能评估和临床试验研究等资料。

3. 临床研究单位的选择

应选择不少于 3 家（含 3 家）临床试验机构，按照相关法规、指导原则的要求开展临床试验。临床试验机构的选择应尽量考虑拟申报产品的特点和预期用途，综合流行病学背景，受试者的选择具有一定的地域代表性。且临床试验机构应具有分子生物学方法检测的优势，实验操作人员应有足够的时间熟悉检测系统的各环节，熟悉评价方案。

4. 病例选择及样本类型

临床试验应选择具有相应肠道病毒感染症状/体征或有密切接触史的人群作为研究对象。申请人在建立病例纳入标准时，应考虑到试剂所适用的各年龄段人群的差异。临床试验入组病例应与产品预期用途中适用人群一致。

临床试验中所涉及的样本类型应为实际临床检测中常用的样本类型。如申报产品所适用的样本类型同时包含鼻咽拭子、咽拭子、粪便/肛拭子、疱疹液、脑脊液或血液等多个样本类型，应针对不同样本类型分别进行临床试验。

5. 伦理学要求

临床试验必须符合赫尔辛基宣言的伦理学准则，必须获得临床试验机构伦理委员会的同意。研究者应考虑临床试验用样本的获得和试验结果对受试者的风险性，应提交伦理委员会的审查意见。

6. 临床试验方案

临床试验实施前，研究人员应从流行病学、统计学、临床医学、检验医学等多方面考虑，设计科学合理的临床研究方案。各

临床研究机构的方案设置应基本一致，且保证在整个临床试验过程中遵循预定的方案实施，不可随意改动。整个试验过程应在临床研究机构的实验室内并由本实验室的技术人员操作完成，申报单位的技术人员除进行必要的技术指导外，不得随意干涉实验进程，尤其是数据收集过程。

试验方案中应确定严格的病例纳入/排除标准，任何已经入选的病例再被排除出临床研究都应记录在案并明确说明原因。在试验操作过程中和判定试验结果时应采用盲法以保证试验结果的客观性。各研究单位选用的参比试剂及所用机型应一致，以便进行合理的统计学分析。另外，考核试剂的样本类型不应超越参比试剂对样本类型的检测要求，如果选择了参比试剂适用样本类型以外的样本，则应选择病毒分离培养鉴定或其他合理方法对额外的样本类型进行验证。

7. 统计学分析

对临床试验结果的统计应选择合适的统计方法，如检测结果一致性分析、阴性/阳性符合率等。对于本类产品对比实验的等效性研究，常选择交叉四格表的形式总结两种试剂的定性检测结果，对定性结果进行四格表卡方或 **kappa** 检验以验证两种试剂定性结果的一致性，统计分析应可以证明两种方法的检测结果无明显统计学差异。在临床研究方案中应明确统计检验假设，即评价考核试剂与参比试剂是否等效的标准。

在数据收集过程中，对于两种试剂检测结果不一致的样本，应采用“金标准”方法或临床上普遍认为质量较好的第三种同类试剂进行复核，同时结合患者的临床病情对差异原因及可能结果

进行分析。

8. 质量控制

临床试验开始前，应进行临床试验的预试验，以熟悉并掌握相关试验方法的操作、仪器、技术性能等，最大限度控制试验误差。整个试验过程都应处于有效的质量控制下，最大限度保证试验数据的准确性及可重复性。

9. 临床试验总结报告撰写

根据《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的要求，临床试验报告应该对试验的整体设计及各个关键点给予清晰、完整的阐述，应该对整个临床试验实施过程、结果分析、结论等进行条理分明的描述，并应包括必要的基础数据和统计分析方法。建议在临床总结报告中对以下内容进行详述。

9.1 临床试验总体设计及方案描述

9.1.1 临床试验的整体管理情况、临床研究单位选择、临床主要研究人员简介等基本情况介绍。

9.1.2 病例纳入/排除标准、不同年龄段人群的预期选择例数及标准、样本编盲和揭盲的操作流程等。

9.1.3 样本类型，样本的收集、处理及保存等。

9.1.4 统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。

9.2 具体的临床试验情况

9.2.1 临床试验所用体外诊断试剂及仪器的名称、批号、机型等信息。

9.2.2 对各研究单位的病例数、年龄分布情况、不同血清型分布情况进行综合，建议以列表或图示方式列出各年龄组和各种

血清型的样本例数。

9.2.3 质量控制，试验人员培训、仪器日常维护、仪器校准、质控品运行情况。

9.2.4 具体试验过程，样本收集、样本保存、样本检测、结果处理、结果不一致样本的确认等。

9.3 统计学分析

9.3.1 数据预处理、差异数据的重新检测或第三方验证以及是否纳入最终数据统计、对异常值或缺失值的处理、研究过程中是否涉及对方案的修改。

9.3.2 结果的一致性分析

计算阳性符合率、阴性符合率、总体符合率，采用适当的统计学方法，如四格表卡方检验或 **kappa** 检验以验证两种试剂定性结果的一致性。

9.4 讨论和结论

对总体结果进行总结性描述并简要分析试验结果，对本次临床研究有无特别说明，最后得出临床试验结论。

(八) 产品技术要求

申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下，根据申请人产品研制、临床评价等结果，依据国家标准、行业标准及有关文献，按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》（国家食品药品监督管理总局通告 2014 年第 9 号）的有关要求，编写产品技术要求。

肠道病毒核酸检测试剂的产品性能指标应主要包括：物理性状、阴/阳性参考品符合率、精密度、最低检测限等。阳性参考

品主要考察对试剂盒适用范围内不同血清型肠道病毒的检测能力，阴性参考品则重点对申报试剂的分析特异性进行验证。

如果申报试剂已有适用的国家标准品、参考品发布，则申请人应在产品技术要求中提出检测要求。

按照《办法》的规定，此类产品为第三类体外诊断试剂，申请人应按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》的要求，以附录形式明确主要原材料、生产工艺及半成品要求，附录的编制应符合相关编写规范的要求。

（九）产品注册检验报告

根据《办法》的要求，首次申请注册的第三类体外诊断试剂产品应在具有相应医疗器械检验资质和承检范围的医疗器械检验机构进行连续 3 个生产批次样品的注册检验。对于已经有国家标准品、参考品的检测项目，在注册检验时应采用相应的国家标准品、参考品进行注册检验，对于目前尚无国家标准品的、参考品的项目，生产企业应建立自己的参考品体系并提供相应的企业参考品。

（十）产品说明书

说明书承载了产品预期用途、标本采集及处理、检验方法、检验结果解释以及注意事项等重要信息，是指导实验室工作人员正确操作、临床医生针对检验结果给出合理医学解释的重要依据，因此，产品说明书是体外诊断试剂注册申报最重要的文件之一。产品说明书的格式应符合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》（国家食品药品监督管理总局通告 2014 年第 17 号）的要求，进口体外诊断试剂的中文说明书除格式要求外，其内容应尽量保

持与原文说明书的一致性，翻译力求准确且符合中文表达习惯。产品说明书中相关技术内容均应与申请人提交的注册申报资料中的相关研究结果保持一致，如某些内容引用自参考文献，则应以规范格式对此内容进行标注，并单独列明文献的相关信息。

结合《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求，下面对肠道病毒核酸检测试剂说明书的重点内容进行详细说明，以指导注册申报人员更合理地完成说明书编制。

1. 【预期用途】

1.1 试剂盒用于定性检测人鼻咽拭子、咽拭子、粪便/肛拭子、疱疹液、脑脊液或其他样本的肠道病毒核酸，适用样本类型应结合实际临床研究完成情况进行确认。

1.2 明确肠道病毒核酸试剂的临床意义，主要用于对肠道病毒感染引起的手足口病等的辅助诊断，以便于临床医生结合病人的其他检查结果进行更加准确的疾病判断和科学的患者管理，应对肠道病毒感染引起的相应临床症状进行描述。

1.3 简单介绍待测目标的特征，如病毒种系渊源、生物学性状、宿主特性、致病性、感染后临床表现、待测靶基因特征等。

1.4 待测人群特征介绍：具有肠道病毒感染症状的患者、相关的密切接触者、地域要求或年龄限制（如有）等，待测人群应与申报产品临床试验中入组人群一致。

1.5 应明确申报产品所能检测病毒血清型及经过临床验证的血清型。

1.6 应强调实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合

理的生物安全防备设施及防护程序。

2. 【检验原理】

详细说明试剂盒技术原理，及核酸分离/纯化方法、原理。说明检测的靶基因座位、序列长度等；介绍引物及探针设计、不同样品反应体系（管）组合、对照品（质控品）设置及荧光信号标记等。如添加了相关的防污染组分（如尿嘧啶 DNA 糖基化酶，即 UDG/UNG 等），也应对其作用机理作适当介绍。

3. 【主要组成成分】

详细说明试剂盒内各组分的名称、数量、成分、浓度等信息，如含有生物源性物质，应说明其生物学来源、活性及其他特性；说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。

试剂盒中不包含但对该项检测必须的组分，应列出相关试剂的生产企业、产品名称、货号以及医疗器械注册证号/备案号（如有）等详细信息。当试剂盒中不包含用于核酸分离/纯化的试剂组分时，应在此注明经验证后推荐配合使用的商品化核酸分离/纯化试剂盒的如上信息。

4. 【储存条件及有效期】

试剂盒的效期稳定性、开瓶稳定性、复溶稳定性、冻融次数要求等，应与相应的稳定性研究结论一致。

5. 【适用仪器】

所有适用的仪器型号，提供与仪器有关的重要信息以指导用户操作。

6. 【样本要求】

明确适用的样本类型。并详细描述样本采集及预处理要求、运输要求、保存条件及期限等。特别是样本采集所需设备及保存

液，需特别明确供应商、货号及注册证号/备案号（如有）。有关描述均应建立在相关性能评价及稳定性研究的基础上。

样本的取材及处理方式等若有通用的技术规范或指南，则应遵循，并在此处引用。

7. 【检验方法】

详细说明实验操作的各个步骤，包括：

7.1 试剂配制方法、注意事项。

7.2 核酸分离/纯化的条件、步骤及注意事项。对照品（质控品）参与样本核酸的平行提取的要求等。

7.3 扩增反应前准备：各组份加样体积、顺序、相关注意事项等。

7.4 逆转录过程的温度和时间设置、PCR 各阶段的温度、时间设置、循环数设置及相关注意事项。

7.5 仪器设置：特殊参数，待测基因、内标的荧光通道选择等。

7.6 质量控制：说明对照品（质控品）的检测要求。

8. 【阳性判断值】

简要总结阳性判断值研究方法及结论。

9. 【检验结果的解释】

结合对照品（质控品）以及样本管中靶基因和内标的检测结果，对所有可能出现的结果组合及相应的解释进行详述。检验结果的解释应以阳性判断值的研究结论为依据。如有适用的临床诊疗或筛查指南，则应在此项下引用，相应检验结果的解释应符合相关指南的要求。

10. 【检验方法的局限性】

应至少包括如下描述：

10.1 本试剂检测结果应结合患者临床症状及其他相关医学检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据。

10.2 针对肠道病毒通用型检测试剂，未包含在申报产品检测型别范围内的肠道病毒血清型。

10.3 不合理的样本采集、转运及处理以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

10.4 针对肠道病毒通用型核酸检测试剂，应明确申报产品所检病毒血清型中经过临床验证的型别，明确其余型别未经临床验证。

10.5 申报产品应明确不同病程不同阶段样本的阳性率不一致。

10.6 取标本期间，接种减毒活疫苗的患者可能会导致检测试剂检测结果呈阳性。

11. 【产品性能指标】

详述以下性能指标：

11.1 对相应国家标准品、参考品（如有）检测的符合情况。

11.2 最低检测限：依据分析性能评估资料，说明产品最低检测限，并简单介绍最低检测限的确定方法。

11.3 企业内部阳性/阴性参考品符合率，阳性/阴性参考品的组成、来源、浓度梯度设置以及评价标准等信息。

11.4 精密度：建议详细描述针对不同肠道病毒基因型，采用不同来源的样本（如人工模拟样本和临床样本）在各个浓度水平进行的精密度评价结果，可采用列表形式描述。

11.5 分析特异性：建议以列表方式说明验证的其他肠道病毒血清型、相关病原体等的交叉反应性及其验证浓度水平。总结潜在干扰物质的评价浓度水平及干扰情况。

11.6 简要描述临床试验的基本信息、试验方法和结论。

12. 【注意事项】

应至少包括以下内容：

12.1 如该产品含有人源或动物源性物质，应给出生物安全性的警告。

12.2 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194号或现行有效版本）等有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。

12.3 强调产品性能仅针对声称的适用样本类型及【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法（包括样本采集液等）进行了验证，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。

三、名词解释

1.PCR-荧光探针法

在 PCR 过程中利用荧光标记的特异性探针，对 PCR 产物进行标记跟踪，释放的荧光能量的变化直接反映出 PCR 扩增产物量的变化，并通过对荧光的采集和分析以达到对原始模板量进行分析的 PCR。

四、起草单位

国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心。

