**II类特殊控制指南：登革热病毒核酸扩增检测试剂**

**行业及美国食品药品管理局工作人员指南**

**文件发布日期：2014年9月10日**

有关本文件的疑问，请致电微生物器械部301-796-5461，或Beena Puri Ph.D. 301-796-6202或电子邮件beena.puri@fda.hhs.gov。

|  |  |
| --- | --- |
|  | **美国卫生和人类服务部**  **美国食品药品管理局**  **器械与放射卫生中心**  **体外诊断和放射卫生办公室**  **微生物器械部** |

**前言**

**公众意见**

## 您随时可以在http://www.regulations.gov提交电子意见和建议，供本机构审议。书面意见请邮寄至美国食品药品管理局待审问题管理处，地址：5630 Fishers Lane, Room 1061, (HFA-305), Rockville, MD, 20852。所有意见都请标示文档编号FDA-2014-N-1166。在文件被下次修订或者更新之前，意见可能不被监管机构所采用。

**额外副本**

额外副本可以通过互联网获取。您还可将电子邮件请求发送至[CDRH-Guidance@fda.hhs.gov](mailto:CDRH-Guidance@fda.hhs.gov%20) ，以接收文件的副本。请使用文档号1200027来标示索取的文件。

**目录**

[1. 前言 4](#_Toc496788632)

[2. 登革热病毒背景 4](#_Toc496788633)

[3. 上市前通知 - 背景 5](#_Toc496788634)

[4. 适用范围 6](#_Toc496788635)

[5. 健康风险 6](#_Toc496788636)

[6. 器械描述（包含特殊控制指南中指定的信息） 7](#_Toc496788637)

[a. 预期用途 8](#_Toc496788638)

[b. 试剂和其他器械组件 8](#_Toc496788639)

[c. 辅助试剂 9](#_Toc496788640)

[d. 测试方法 10](#_Toc496788641)

[e. 样本储存和运输条件 11](#_Toc496788642)

[f. 测试结果的解释 11](#_Toc496788643)

[7. 性能特征 12](#_Toc496788644)

[a. 一般研究建议 12](#_Toc496788645)

[b. 分析研究 12](#_Toc496788646)

[c. 对照 16](#_Toc496788653)

[d. 核酸提取 17](#_Toc496788657)

[e. 测定临界值 18](#_Toc496788658)

[f. 样本收集和处理 19](#_Toc496788660)

[g. 临床研究 19](#_Toc496788661)

[8. 标签 22](#_Toc496788668)

[a. 预期用途 22](#_Toc496788669)

[b. 器械描述 22](#_Toc496788670)

[c. 使用步骤 23](#_Toc496788671)

[d. 使用说明 23](#_Toc496788672)

[e. 警告、注意事项和局限性 23](#_Toc496788673)

[f. 样本收集 24](#_Toc496788674)

[g. 测试结果的解释 24](#_Toc496788675)

[9. 上市后措施 24](#_Toc496788676)

[10. 参考文献 25](#_Toc496788677)

**II类特殊控制指南：登革热病毒核酸扩增检测试剂**

**行业和美国食品药品管理局工作人员指南**

1. **前言**

制定本特殊控制文件旨在支持将登革热（DEN）病毒（DENV）核酸扩增检测（NAAT）试剂分类为II类（特殊控制）。DENV NAAT试剂属于医疗器械，用于诸如检测出现与登革热一致的体征和症状（轻度或重度）的患者血清和血浆中病毒RNA的DENV血清型1、2、3或4的实时逆转录酶聚合酶链反应（RT-PCR）等方法。这些器械由用于扩增和检测DENV血清型1、2、3或4的病毒RNA的引物、探针、酶和对照试剂组成。该器械旨在用于与其他临床和实验室检查结果相结合对患者进行诊断。

本指南确定了FDA认为将能缓解与这些器械相关的健康风险并提供合理的安全性和有效性保证的措施。在重新分类该器械的最终规则生效后，提交DENV NAAT试剂510（k）的企业需要：（1）遵循本特殊控制指南中规定的特定缓解措施，或（2）使用替代缓解措施，但必须向本机构证明，该企业确定的替代措施至少将提供安全性和有效性的同等保证。

1. **登革热病毒背景**

DENV是全球热带和亚热带地区发热性疾病的重要病因。DENV是黄病毒科的一种病毒，属于单股正链RNA病毒。登革热和出血性登革热/登革热休克综合征是由四种密切相关但血清型不同的DEN病毒（称为DEN-1、DEN-2、DEN-3和DEN-4病毒）之一感染引起的。DENV由被感染*Aedes*的蚊子通过叮咬传播给人类。蚊虫叮咬后的潜伏期，在出现症状前3〜8天。原发性或典型性登革热的特征在于高烧和以下两种或更多种症状：严重头痛，眼眶后眼痛，肌痛，斑丘疹，关节痛，淋巴结肿大和白细胞减少症，其通常在五天内自发痊愈。一种更为严重的DENV疾病称为出血性登革热（DHF），其中一部分患者发展为登革热休克综合征（DSS）。虽然DHF可能发生于原发性DENV感染，但通常发现于由不同DENV血清型引起的继发性DENV感染个体。患有DHF的个体显示出显著的血小板减少症，其可导致严重的出血和休克表现（DHF/DSS）。

可以在出现症状的最初5天内和/或恢复早期（症状超过5天）通过检测血清样本来诊断急性（持续）或最近的DEN感染。在急性发作期间，发热后第3-5天产生可检测到的抗DENV IgM抗体。通过检测出现体征和症状的个体的血清或血浆中的DEN病毒RNA基因组来确定DENV感染（轻度或重度）。

1. **上市前通知 - 背景**

FDA得出结论，有必要采取特殊控制结合“联邦食品、药品和化妆品法案”（FD＆C法案）的通用管制，以为DENV NAAT试剂的安全性和有效性提供合理保证。拟销售该类型器械的制造商必须：（1）遵循FD＆C法案的通用管制要求，包括21 CFR 807子部分E所述的上市前通知要求；（2）解决本指南中确定的特定安全性和有效性问题；（3）在销售该器械前获得FDA的实质等同性判定。

本指南确定了DENV NAAT试剂的分类规定。此外，本特殊控制指南的其他部分列出了健康风险，并描述了缓解措施，如果制造商遵循这些措施并结合通用管制措施，通常将能解决与该器械相关的风险，并将有助于上市前通知（510（k））的及时审查。本文件补充有关DENV NAAT试剂上市前通知申请的具体内容要求的其他FDA文件。有关510（k）提交的更多信息，请参阅21 CFR 807.87和器械和放射卫生中心（CDRH）器械建议：综合监管援助。1

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

1 http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/default.htm.

## 适用范围

本文件的适用范围仅限于按照21 CFR 866.3946鉴别和分类的器械。

**21 CFR 866.3946** - 登革热病毒核酸扩增检测试剂

1. 鉴别。登革热病毒核酸扩增检测试剂是由引物、探针、酶和对照试剂组成的器械，用于扩增和检测出现与登革热一致的体征和症状（轻度或重度）的患者血清和血浆中病毒RNA的DENV登革热病毒血清型1、2、3或4。鉴别人血清和血浆中登革热病毒血清型1、2、3或4有助于临床实验室结合其他临床和实验室检查结果诊断登革热病毒感染。
2. 分类。II类（特殊控制）。特殊控制文件是FDA指南“II类特殊控制指南：登革热病毒核酸扩增检测试剂”。有关本指南文件的可用性，请参阅§866.1（e）。

## 健康风险

FDA已经确定了假阴性检测结果和假阳性检测结果的风险，这两者都可能导致个人和/或公共健康后果，因此，与该器械相关的健康风险需要特殊控制。下表列出了这些健康风险以及解决这些风险的建议措施。

登革热病毒（DENV）核酸扩增检测（NAAT）试剂按照指示检测失败或结果解释错误可能导致误诊，对患者管理有重大影响。

个人的假阳性检测结果可能会导致不必要的治疗，也可能导致疏于对真正病因的实验室评价；在疫情调查的情况下，假阳性结果可能导致不必要的启动带菌蚊子控制措施。

假阴性结果可能导致不适当地使用抗生素或未能接受适当的静脉注射液或血小板输注治疗，假阴性结果也可能导致延误潜在疫情爆发原因的确认，并延误启动适当的带菌蚊子控制措施。

登革热感染的症状（即：发烧、头痛、关节痛、眼眶痛、皮疹、淋巴结肿大和白细胞减少症）与急性发热性疾病的其他病因重叠。在没有能够明确区分DENV感染与其他发热性疾病的症状或体征的情况下，DENV诊断测试的结果很可能会有很强的影响，将发热性疾病归因于DENV感染。

下表中，FDA已经确定了与使用需要特殊控制的DENV NAAT试剂相关的风险。如下表所示，本指南与拟议的21 CFR 866.3946小节相结合，提出了缓解这些已识别问题的措施。根据本指南，拟销售这种器械的制造商必须在提交上市前通知前进行风险分析，以识别其器械所特有的任何其他风险。上市前通知必须描述所使用的风险分析方法。如果您选择使用替代方法来降低本指南中确定的特定风险，或者您或他人识别到使用此类器械的其他潜在风险，则您必须提供详细信息，说明用于缓解这些风险的方法以及您所选择方法的依据。

**表1 - 已识别的健康风险和缓解措施**

|  |  |
| --- | --- |
| **已识别的健康风险** | **缓解措施** |
| 个人的假阳性检测结果可能会导致不必要的治疗，也可能导致疏于对真正病因的实验室评价；假阳性结果可能导致不必要的启动带菌蚊子控制措施。 | 器械描述  包含信息  特别指定  控制指南（第6节）  性能特征（第7节）  标签（第8节）  上市后措施（第9节） |
| 假阴性检测结果可能导致不正当地使用抗生素或延误治疗以防止因出血性登革热或登革热休克综合征引起的死亡，假阴性检测结果也可能导致延误启动带菌蚊子控制措施。 | 器械描述  包含信息  特别指定  控制指南（第6节）  性能特征（第7节）  标签（第8节）  上市后措施（第9节） |
| 解释结果错误 | 标签（第8节） |

1. **器械描述（包含特殊控制指南中指定的信息）**

您必须在510（k）中提交符合21 CFR 807.87（a）和（f）要求的器械描述，并且您必须根据21 CFR 807.92(a)(3)的要求确定已合法销售的实质等同器械。此外，您还必须确定您的器械的适用法规和产品编码；您必须列表比较实质等同器械（或相同预期用途的另一个合法销售的器械）与您的器械之间的相似点和差异。您在器械设计中可以参考支持您的器械的预期诊断用途的适当的同行评议文章以及特定的测试原则。您必须详细描述每个器械组件。

此外，您还必须提供以下描述性信息，以充分表征您的器械用于检测人血清和血浆或其他人临床样本中的DENV RNA。

### 预期用途

预期用途必须指明核酸靶标（例如，由该器械检测的DENV RNA区域）、测试适用的样本类型（即血清或血浆）、测试适用的临床指征、以及测试的具体人群。预期用途必须说明本测试是定性测试以及任何特定的使用条件。预期用途还必须具体说明，作为临床指征的一部分，该测试是否可用于诊断个别患者（即从DEN流行地区返回的症状个体）和/或在疫情调查期间诊断患病个体。

您必须在510（k）中清楚地描述与您的产品的预期用途有关的以下信息：

* 您的器械可以检测或不能检测的不同DENV血清型和病毒株。
* 该器械的测试结果如何用于辅助实验室从症状患者的临床样本中鉴定登革热病毒RNA。

### 试剂和其他器械组件

您必须描述您的器械设计要求，以解决或缓解与DENV的目标RNA核酸检测方法中使用的引物、探针、仪器和对照试剂相关的风险。下面给出了一些例子：

* 设计冷冻干燥试剂盒或任何其他封闭式管道测试系统（例如，预充式管道），以最大限度地减少由于污染物或携带物引起的假阳性结果。
* 设计一种或多种测定法，以靶向DENV独特的不同RNA序列。
* 开发阳性对照、阴性对照和抑制对照，以确保准确的测试结果。
* 开发提取和纯化方法，以从人血清和血浆临床样本中得到适宜质量和数量的DEN RNA样本，用于用您的试剂在测试系统上进行检测。
* 优化您的试剂和测试方法用于推荐的仪器。
* 加入任何非标准设备或方法的插图或照片（如适用）。

您必须在510（k）中提供性能信息，以支持您的设计要求得到满足的结论。您必须提供选择特定RNA靶序列和选择引物和探针的理由。

您必须在器械包装说明书中列出您认为最适合每个特定样本类型的特定提取方法的名称和目录号。

### 辅助试剂

辅助试剂是在器械标签中被指定为“需要但未提供”的那些试剂，以便按照其使用说明书中的说明进行测定，并达到在测定标签中宣称的测试性能。仅就本文件而言，所涉及的辅助试剂是必须按照具体名称指定的试剂，以便您的器械能够达到其标示的性能特征。例如，如果您的器械标签指定使用特定试剂（如：X牌提取缓冲液或其他等效缓冲液），并且使用任何其他提取缓冲液可能会改变在您的标签中报告的器械性能特征，则X牌提取缓冲液或其他等效缓冲液即是本文件所指的辅助试剂。2

相比之下，如果您的器械需要使用95％乙醇，并且任何品牌的95％乙醇都将能够使您的器械达到标签中提供的性能特征，那么95％乙醇不是本文件所指的辅助试剂。

如果使用您的器械的仪器指定了一种或多种辅助试剂，则您必须说明如何确保使用您的器械和这些辅助试剂按照您的说明进行测试产生的结果与您的上市前提交中确定的性能一致。您的计划可以包括质量体系方法、产品标签和其他措施的应用。

为了解决特殊控制的这一方面，您的510（k）提交必须包括下述信息。FDA将评价您的计划是否有助于缓解该器械存在的风险，以为该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。

1. 您的510（k）中必须包含使用辅助试剂的风险评估，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您的测定提供的使用说明不一致相关的风险、以及可能导致您的检测结果不正确的任何其他问题。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

2即使您确定在测定中可以使用一种或多种替代辅助试剂，这些替代试剂仍然可以是所述的辅助试剂。如果您不确定特殊控制措施的这一方面是否适用于您的器械，我们建议您咨询FDA。

1. 使用风险评估作为适用性的依据，您必须在510（k）中描述您将如何通过对辅助试剂采取必要的控制措施来降低风险。在适用的情况下，这些可能包括：

* 用户标签，以确保适当使用辅助试剂（参见“标签”部分的进一步讨论）。
* 评估用户遵守辅助试剂的标签说明的计划。
* 辅助试剂的材料规格。
* 确认试剂批次以保证您的器械的适当性能。
* 稳定性试验。
* 投诉处理。
* 纠正和预防措施。
* 提醒用户发生涉及辅助试剂的问题将影响试验性能的计划。
* 根据您的器械使用说明书，为确保您的测试试剂与所确定的辅助试剂联合使用的安全性和有效性，您必须解决的任何其他问题。

此外，您还必须提供测试数据，以确定您提供或推荐的质量控制足以检测用辅助试剂的性能或稳定性问题。

如果您有关于辅助试剂的确定、使用或控制的疑问，您可以联系FDA寻求建议。

### 测试方法

您必须在510（k）提交中详细描述您的器械用于检测和区分血清和血浆中病毒核酸（RNA）的四种DENV血清型1、2、3或4的操作原理。您必须具体描述测试条件、方法和对照，以避免出现可能导致假阳性和假阴性结果或产生生物安全危害的条件。这些包括但不限于：

* 对于监测污染和提取效率的任何外部对照和/或内部对照的描述或建议（例如，在测定中产生阳性信号并显示RNA的成功回收以及RNA提取试剂的完整性的内部对照）。
* 测试方法的总体设计，包括纳入推荐测试方法的控制元素。
* 用于监测对测定性能和检测具有不利影响的程序错误或因素（如主混合物降解）的特征和附加对照。

您还必须描述使用说明中包含的降低与DEN检测相关风险的所有其他步骤、方法和操作（参见第8节 - 标签）。

### 样本储存和运输条件

如果您推荐样本储存和/或运输条件，您必须证明，对于在推荐的存储期间内的多个时间点的样本以及在推荐的存储温度范围的两个端点的样本，您的器械可以产生相同的结果。您可以使用临床和实验室标准研究所（CLSI）文件H18-A4“血液样本的处理和加工方法” [参考文献1]中描述的方法。

### 测试结果的解释

您必须描述如何确定阳性、阴性、不明确或无效结果，以及如何进行解释（如果适用）。对于如何确定解释性算法，应有明确的解释。

您必须提供确定测定阴性结果的临界值。如果该测定只有两种输出结果（阴性/阳性），则该临界值也定义了测定的阳性结果。

如果测定具有不明确的区域，则您必须提供不明确区域的范围（限值）。如果您的测定所报告的输出项之一可能是一个不明确的结果，您必须进行解释并提供关于用户如何跟踪不明确结果的建议。如果您对初始不明确结果的解释是需要重新检测，则您必须提供：（1）重新检测应使用相同的核酸制备样本、新提取样本还是新患者样本进行检测的建议；（2）通过结合初始不明确结果和重新测试后的结果来确定最终结果的算法（请注意，这些算法必须在评价测定的临床性能的关键临床研究开始之前开发完成）。

如果检测结果无效，则必须描述如何定义无效结果。如果内部控制是确定无效结果的一部分，则必须提供关于解释无效结果的每个可能的对照结果组合的建议。您必须提供如何跟踪无效结果的建议（即，结果是否应报告为无效或是否推荐重新测试）。如果建议进行重新测试，您必须提供类似于不明确结果重新测试的信息（即重新测试是否应使用相同的核酸制备样本、新提取样本或使用新的患者样本）。

此外，您必须描述如何随时间监测结果，以确定由于DENV中的核酸变异或已知或出现新的DENV病毒株时的性能变化，或由于现有患病率相对于您的产品进行评价时的患病率的偏差而导致的性能变化。

## 性能特征

### 一般研究建议

您提交的510（k）必须详细描述关于您为确定下面列出的每个性能特征而进行的研究。

必须包括前瞻性临床研究，以确定您的器械在与拟议的预期用途类似的条件下的性能。一般来说，对于临床研究和再现性研究，您必须在该器械的拟销售国家的三个测试机构进行测试（即临床实验室测试中心）。

您必须在510（k）提交中提供适当的具体信息，描述您在测定开发期间使用的方案，以便FDA在审查期间准确地解读您的申请中包含的验收标准和数据摘要。此信息对于帮助用户了解标签中的信息也很重要。当提及CLSI（临床和实验室标准研究所）方案或标准时，您必须说明遵循方案或指南的哪些具体方面。

我们建议您在开始您的临床研究计划之前联系FDA，以获得有关您计划纳入510（k）提交中的研究和预期用途的反馈意见。

### 分析研究

您必须在510（k）中确定您的DENV NAAT试剂的以下性能特征。

### 分析灵敏度

1. 检测限

您必须使用培养和定量（pfu/ml）的全病毒储备液来确定所有四种DEN-1、-2、-3和-4血清型的检测限（LoD）。研究必须包括测试所有四种血清型的活DENV的系列稀释液，并用DENV阴性人血清或血浆或等效基质制备每个稀释度的3-5份平行试验。您必须将LoD报告为达到95％检测率的病毒水平。必须通过制备LoD浓度下的另外至少20份平行试验来确认LoD，并证明95％的时间可以检测到病毒。您的测定的LoD必须与pfu/ml和RNA拷贝数相关。

您必须确定每种分析物在最常用或最具挑战性的基质中通过该器械进行测试的LoD。我们建议您在设计研究时参考CLSI文件EP17-A [参考文献 2]。

1. 分析反应性

您必须通过测试所有四种DEN-1、-2、-3和-4血清型的其他病毒株来进一步确认测定的LoD，即，应通过您的测定方法来测试一组表征良好的DEN样本，以确定与不同的DENV血清型循环株的反应性。

您可以引用您的研究中未包含的DEN病毒株的文献和/或其他证据；基于该器械开发时的临床和流行病学趋势，可以适当的纳入其他DEN病毒株。

必须将病毒株反应性测试的结果（即，未被该器械检测到的病毒株）列在器械的标签中。

### 分析特异性

1. 交叉反应性：

您必须测试与表2中列出的可能引起发热性疾病的病原体的潜在交叉反应性。特别是必须进行研究以表征在其他黄病毒（例如，圣路易斯脑炎、西尼罗河、黄热病、日本脑炎）、甲病毒（例如，东方马脑炎）和引起发烧和皮疹症状的其他病毒和细菌（如，肠道病毒、单纯疱疹）存在下的性能。微生物必须在医学相关的病毒和细菌水平（细菌通常为106 cfu/ml或更高，病毒为105pfu/ml或更高）下进行测试。用于交叉反应性研究的病毒和细菌分离物的特征和滴度必须在测试前进行确认。

### 表2. 用于交叉反应性研究的微生物

|  |
| --- |
| **测试微生物** |
| 西尼罗病毒 |
| 日本脑炎病毒 |
| 圣路易脑炎病毒 |
| 黄热病毒 |
| 甲型肝炎病毒 |
| 乙型肝炎病毒 |
| 丙型肝炎病毒 |
| 爱泼斯坦巴尔病毒 |
| 博氏疏螺旋体 |
| 钩端螺旋体病 |
| 巨细胞病毒 |
| VZV |
| 疱疹 |
| 东方马脑炎病毒 |
| 基孔肯雅病毒 |
| 甲型和乙型流感病毒 |
| 麻疹病毒 |

1. 干扰

您必须对您的器械进行全面的干预研究。潜在的干扰物质包括但不限于所选择的样本的其他组分（例如，白细胞、蛋白质、全血、血红蛋白）以及加标到样本中用于对照的对照品或试剂。您必须测试在LoD附近时的干扰。必须在潜在最高浓度下评价每种干扰物质（“最坏情况”）。如果没有观察到显著的临床影响，则不需要进一步测试。我们建议您参考CLSI文件“临床化学中的干扰测试”EP7-A2 [参考文献 3]了解更多信息。其他潜在的干扰物质包括但不限于以下：

### 表3. 用于干扰研究的物质

|  |
| --- |
| **物质** |
| 胆红素 |
| 胆固醇 |
| 脂质 |
| 肝素 |
| 基因组DNA |
| 柠檬酸钠 |
| EDTA |
| 白蛋白 |
| 血红蛋白 |

### 残留和交叉污染研究（适用于多样本测定和需要仪器的器械）

您必须证明您的器械不会发生残留和交叉污染。在残留和交叉污染研究中，必须根据该器械的操作功能，将高阳性样本与阴性样本串联交替使用。您必须交替运行至少五次高阳性和五次高阴性样本。残留研究中的高阳性样本的浓度必须足够高，以从预期使用人群的阳性患者样本中获得95％以上的结果。高阴性样本所含的分析物浓度应低于临界值，使得该样本的重复测试结果在大约95％的时间为阴性。然后可以通过比较残留研究中的高阴性样本的阴性结果百分比是否超过预期的95%来估计残留和交叉污染的影响。

### 精密度/再现性/重复性

*实验室内精密度/重复性*

对于包含仪器或自动化组件的器械，您必须进行实验室内精确密研究。您可以在内部进行这些研究，即在您自己的公司内。

您必须测试至少12天（不一定是连续的）的变异性来源（例如，操作员，操作日，测定运行），每天运行两次，每个样本每次运行都运行两个平行试样。如果校准周期短于2个月，这些测试日必须跨越至少2个校准周期。测试面板必须由4个病毒负载水平的3-6个样本（1-2个病毒株）组成，包括：

* “阴性”样本：分析物浓度低于临床临界值，使得该样本的重复测试结果在100％的时间为阴性的样本。
* “高阴性/低阳性”样本（C20至C80）：分析物浓度低于临床临界值，使得该样本的重复测试结果在约20％至80％的时间为阴性。

#### “低阳性”样本：分析物浓度正好高于临床临界值，使得该样本的重复测试结果约95％的时间为阳性。

#### “中度阳性”样本：分析物浓度较高，预期大约100％时间的测试结果为阳性。

*再现性*

再现性研究的方案可能会因测试的形式而略有不同。一般来说，DENV NAAT试剂必须符合以下方案：

* 在三个测试机构（两个外部机构，一个内部机构）进行再现性研究。
* 使用五天测试方案，包括每天至少两次运行（除非测定设计排除每天多次运行），每次运行3个平行面板。
* 每天至少有两名操作员在各自设施上进行测试。您必须对操作员进行培训，培训的程度与该测试试剂盒上市后拟对用户进行的培训程度相同。
* 样本面板必须与上述重复性研究中所述相同。

有关精密度和再现性研究设计，您可以参考CLSI文件EP5-A2 [参考文献4]、EP12-A2 [参考文献5]和EP15-A2 [参考文献6]。

### 对照

在进行下述性能研究时，您必须在分析和临床研究期间每天进行适当的外部对照测试。有关对照的更多信息，您可以联系FDA OIVD的微生物器械部。一般来说，您必须包括以下类型的对照：

### 阴性控制

*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移介质以及除核酸以外的所有测定组分。该对照用于排除扩增反应中靶核酸的污染或增加的背景。对于自包含的测试（即单个样本在含有所有预分析和检测步骤的一次性耗材中进行分析的测试），应以一定频率（每天或每周）进行阴性对照，以控制污染。

*阴性样本对照*

阴性样本对照包含非靶核酸，或者如果用于评价提取程序，则其包含整个生物体（而不是DENV）。它揭示了非特异性启动或检测，并且指示在不存在靶序列的情况下不能获得信号。可接受的阴性样本对照材料的实例包括：

* 来自非DENV感染个体的患者样本
* 含有非目标生物体的样本
* 替代阴性对照（例如，包装的RNA）

### 阳性对照

*完整测定的阳性对照*

阳性对照包含靶核酸，用作整个测定过程的对照，包括RNA提取、扩增和检测。它旨在模拟患者样本，以实验室质量体系（QS）确定的频率同时与患者样本一起运行。可接受的阳性测定对照材料的实例包括：

* 来自登革热感染个体的患者样本，或加标活DENV的基质
* DENV组织培养上清液

*用于放大/检测的阳性对照*

用于扩增/检测的阳性对照包含浓度在定性测定的检测限附近的纯化靶核酸。如果获得阴性结果，则它验证了仪器和反应组分的完整性。它表示如果目标存在于样本中，则可以检测到该目标。

### (3) 内部对照

内部对照是与靶核酸共提取和/或共扩增的非目标核酸序列。它用作试剂的完整性（聚合酶、引物等）、设备功能（热循环仪）和样本中存在扩增抑制剂的对照。可接受的内部对照材料的实例包括与DENV RNA共提取的人核酸和扩增人类管家基因的引物（例如，RNaseP）。是否需要这类对照取决于器械的具体情况[参考文献7]。

### 核酸提取

不同的提取方法可能产生不同数量和质量的DENV RNA，因此提取方法对成功的结果至关重要。从人血清或血浆中纯化DENV RNA可能具有一定的挑战性，因为生物样本在人类基因组DNA背景下可能含有低病毒载量，以及高水平的蛋白质和其他污染物。

由于这些原因，您必须评价您选择的提取方法对于测定的性能的影响，以确保预期用于该测定的令人满意的DENV RNA数量和质量。此外，您必须通过建议与该测定一起运行的整个分析过程（包括提取程序）评价测定的分析和临床性能特征。这必须包括用每个提取方法证明您的测定的LoD和再现性。

此外，外部机构研究（包括再现性和临床研究）必须包括您的标签中规定的提取方法。

无论您是否打算在测试试剂盒中提供提取和制备核酸所用的试剂，或是指示用户购买合适的试剂，您都必须进行这些评价。

如果您推荐或包括多种提取方法，您必须证明每种方法的LoD和再现性。如果提取方法使得整体测定性能的变异性降到最低，则您可以将提取方法变量与再现性研究中每个测试机构的性能变量进行组合。例如，如果您推荐使用三种不同的提取方法，您可以设计一个再现性研究，在每个测试机构各评价一种提取方法：测试机构1提取方法A，测试机构2提取方法B ，测试机构3提取方法C 。如果从上述测试板产生的结果没有显示出显著差异，则不需要进行进一步的再现性研究。然而，如果来自三个测试机构的初始提取等效性研究显示测定性能存在统计学显著差异，则必须扩展再现性研究，包括在三个测试机构测试每种提取方法（例如，测试机构1提取方法A、B和C；测试机构2提取方法A、B和C；测试机构3提取方法A、B和C）。

除了分析研究（LoD和再现性）外，在临床试验期间，每种提取方法必须在至少一个临床测试中心使用，以产生临床性能数据。如果扩展再现性测试的结果显示提取方法之间的有效性存在显著差异，则认为来自每个临床测试中心的数据（使用不同的核酸提取方法）不等同，不得将其合并，而应单独进行分析。因此，可能需要额外的前瞻性临床样本，以支持所要求的提取方法。

### 测定临界值

### 您必须解释如何确定测定临界值以及如何验证临界值。临界值必须使用适当的统计方法来确定。为支持您确定的临界值，在试点研究中，对于不含任何DENV RNA的临床样本，您可以提供诸如结果分布、第95和99百分位数、非阴性（阳性或不明确）结果百分比等数据。可根据临床样本的试点研究的接收者操作曲线（ROC）分析的灵敏度和特异性的相关水平来证明适当临界值选择的合理性（关于ROC分析的详细信息，请参阅CLSI文件GP10-A [参考文献8]）。如果测定存在不明确区域，则您必须解释如何确定不明确区域的限值。必须在与该器械确定的预期用途一致的独立人群中验证您的器械使用预先规定的临界值（如果适用）的性能。

### 样本收集和处理

您必须确定您的测定试剂盒拟检测的样本类型。当DENV可能与样本分离时，必须在疾病过程中某一时间从适当的解剖部位或来源收集样本。

目标分析物的质量和数量可以高度依赖于诸如样本来源、收集方法、处理（例如运输和储存时间和温度）等因素。您在510（k）中提供的测试结果必须验证器械在标签中建议的所有条件下都能保持可接受的性能（例如，准确性、再现性）。例如，您必须使用在推荐的时间和温度条件下储存和/或运输的样本的等分试样来评价推荐的储存时间和温度（包括冻融循环）对样本稳定性的影响。您必须说明所有样本收集和处理条件和稳定性参数的验收标准。

用于鉴定病原体的所有样本收集和处理都遵循所有适用的州和联邦生物安全指南。对于样本处理中的标准预防措施，请参阅相关临床和实验室标准研究所（CLSI）的最新版本[参考文献9]。

### 临床研究

您必须进行临床研究以确定您的器械的具体预期用途的测定性能。样本收集方法可能会因预期用途是用于辅助诊断特定个人或用于辅助调查疑似登革热病毒爆发而有所不同。对于个体患者的诊断，样本必须从预期使用人群（即体征和症状与登革热或出血性登革热相符的患者）中前瞻性收集和测试。新鲜样本是这些研究的首选，尽管可能用预先收集的存档样本补充新鲜样本。3为使用前瞻性收集的存档样本来评价登革热病毒测定，必须证明样本冷冻或其他保存技术不会影响分析物的稳定性，并且选择了适当的样本并采取适当措施来确定和消除或缓解研究组间的任何偏倚。如果您使用存档样本来评价测定，则必须确保没有选择性地使用样本，即，对所有样本都进行测试。测试过程中必须对样本设盲，以避免可能的偏倚。如果对新鲜和存档/冷冻样本都进行了测试，那么您必须分别分析这两个数据。

\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_\_

3 本指南中，我们将前瞻性收集的存档样本定义为从符合研究纳入标准的所有患者顺序收集的样本；不可根据已知的结果选择性地选取样本，并且所有测试都必须由对以前的结果或患者特征完全不了解的研究者进行。样本必须尽可能新鲜或适当储存。

每项临床研究的方案都必须列入510（k）提交中。强烈鼓励申办方在开展临床研究前与FDA讨论研究方案。

在临床试验设计期间，还必须解决以下问题：

### 参考测定方法

您必须基于复合参考方法（即，其中一项以上测定的结果，例如登革IgM酶联免疫吸附测定（ELISA）和/或血细胞凝集抑制（HAI）和RT-PCR可能是最合适的）评估和比较您的器械性能与适当的参考方法或预先确定的算法。

参考方法或复合参考方法必须被良好表征和验证。您必须提供已发表的文献或实验室数据，以支持登革热血清型检测和区分的验证。验证必须包括LoD和分析反应性数据。RT-PCR的LoD必须与所提交器械的分析灵敏度相似。

如果您将您的器械与另一种分子检测方法进行比较（即，进行传统的RT-PCR测定，然后对扩增子进行测序，作为登革热血清型检测和区分的参考/对比方法），参考/对比PCR方法的引物序列必须与您的器械中包含的引物序列不同。必须对扩增子的两条链都进行测序（即，双向测序），必须证明所生成的序列至少含有可接受的200个碱基对（例如，通过PHRED或类似的软件包测量的质量评分为20或更高），并且必须证明它与参考或共享序列匹配[参考文献 10，11]。

FDA将核酸提取方法（手动或自动）以及试剂、测定条件和仪器视为DENV NAAT试剂的重要部分。因此，DENV NAAT试剂的最终形式必须包含确定的核酸提取方法、测定试剂、测定条件和仪器。临床研究中使用的每个NAAT参考方法都必须纳入适当的对照。

有关NAAT参考方法的使用和/或制定使用复合参考方法的预定算法的更多信息，您必须联系FDA。

### 研究方案

临床研究方案必须在研究开始之前由研究者完成并进行审查。研究方案至少必须包括完整的患者入选和排除标准、所需样本的类型和数量、研究方法和详细的统计分析计划。您的510（k）提交文件必须包含原始研究方案、方案修正案和任何其他相关研究信息的副本。

作为提交前过程的一部分，我们鼓励申办方联系FDA，请求审查他们提出的研究方案和样本类型的选择。对于可能研究不同的测试预期用途，或者申办方计划首次提交510（k）的情况，特别建议您联系FDA。

### 样本类型

血清和血浆样本是该器械的样本基质。必须从每个研究机构的符合特定研究纳入标准的所有患者中顺序收集样本。您在研究中必须包括的样本总数将取决于预期的测定性能和研究人群中DENV感染的患病率。

### 研究机构

对于单个患者诊断的预期用途，您必须在代表该器械最终使用的测试环境（例如临床实验室）的至少三个不同地理位置的研究机构，由临床实践中可能进行该测试的实验室人员进行测试。至少应有一个研究机构在美国，已评价该测定的特异性。建议申办方在开始研究之前，与FDA探讨疫情爆发调查预期用途的适当研究机构，因为这些研究机构更可能需要使用前瞻性存档的样本。

### 研究人群

您必须对出现DEN体征和症状（例如：高烧，严重头痛，眼睛后疼痛，关节疼痛，肌肉和关节疼痛，皮疹，恶心和呕吐，鼻子或牙龈出血，容易瘀伤，低白细胞计数）的个体进行研究。大多数样本应在症状发作后尽快收集（以确保由足够数量的阳性样本），尽管较晚时间收集的样本对于估计器械性能随症状发作后时间的变化可能具有一定价值。入选临床研究的患者应符合疑似DEN感染的研究纳入和排除标准。

### 临床研究结果的说明

分析必须基于预期用途，即分析单位必须是单个样本，或通过测试个体的急性和恢复期样本，

研究分析必须考虑收集的所有样本。器械性能与参考方法的比较必须表示为2行2列的格表。必须包括器械性能与患者特征（例如：受试者年龄，相对于发病时间的样本收集时间，研究机构等）的相关性的附加分析。在结合新鲜样本和存档样本的研究中，分析必须比较每种样本类型各自的性能，然后再进行组合分析。

510（k）提交中的所有研究数据都必须以Microsoft Excel、分隔文本或SAS传输文件的形式提供。数据文件必须包括适当的注释或单独的码本，并且必须包括所有主要和派生的变量，例如用于确定DEN诊断的临床参考算法的结果。应用于数据集的统计方法的描述必须足够详细，以便解释可能是可接受的阳性一致性的较低估计值，并应在开始临床研究之前与FDA探讨。

## 标签

DENV NAAT试剂与其他器械一样，受法定的标签要求（包括FD＆C法案第201(n) 和502(a)节；21 USC § 321(n)和352(a)）的约束。这些IVD器械必须提供详细的使用说明和适当的警告和注意事项（FD＆C法案第502(f)节；21 USC § 352(f)）。所有IVD器械的具体标签要求详见21 CFR 第801和809部分。

DENV NAAT试剂的标签还必须包含以下描述的信息。此标签信息有助于缓解本指南中前面确定的风险，以确保安全有效地使用这些器械。器械标签必须符合21 CFR第801和809部分的要求，即使下面没有提及。

### 预期用途

预期用途必须指明该器械是诊断DENV感染的辅助手段。您还必须指明您的测定所能检测到的DENV血清型，以及如果您的测试是推定的，需要采取哪些附加的具体确认措施来确认您的测试结果。

### 器械描述

在器械描述中，您必须简要描述此类器械中使用的测定方法。

### 使用步骤

本节必须包括整个分析过程的总体描述，从患者样本的收集到结果报告。

### 使用说明

您必须提供清晰简明的说明，描述使用该器械的步骤，以及将不准确结果风险将至最低的对照类型。说明必须鼓励使用额外的对照措施和测试对照材料，以确保安全有效地使用。

### 警告、注意事项和局限性

除了与您的特定测定相关的任何其他局限性和警告外，您还必须在局限性中包括以下声明（如适用）：

* 只能对临床症状与登革热或出血性登革热一致的患者进行检测。
* 免疫抑制患者的检测结果必须谨慎解释。
* 阳性预测值取决于病毒存在的可能性。
* 测定结果的解释应结合其他实验室检查结果和患者的总体临床状况。
* 阴性结果不能排除登革热病毒感染，不应作为治疗或其他患者管理决策的唯一依据。应采用抗DENV IgM检测法对在发热后3-6天内收集的阴性样本进行重新测试，以提高登革热诊断的可能性。
* 如果样本收集、运输或处理不当，则可能会产生假阴性结果。如果样本中存在扩增抑制剂，或者样本中的微生物数量较少，也可能会产生假阴性结果。
* 检测到病毒RNA可能并不能指示存在感染性病毒，或指示登革热是临床症状的致病因子。
* 本测试不能排除其他细菌或病毒病原体引起的疾病。
* 新生儿脐带血检测、产前筛查或无登革热症状的一般人群筛查的检测性能指标尚未确定。FDA未批准该检测用于筛选血液或血浆供体。
* 该测试用于监测登革热治疗的性能指标尚未确定。
* 该器械受到特殊控制要求的约束，仅可配送到符合以下条件的实验室：（i）经过标准化分子测试方法培训并且具有病毒诊断专业知识的经验丰富的人员；（ii）适当的生物安全设备和控制措施。

### 样本收集

您必须提供关于应使用什么类型的样本以及样本（抗原或抗体）收集的最佳时间或窗口期的指导。您必须说明在本测定中是否有不适用的样本。您还必须提供样本储存、冻融循环次数以及您的器械的最佳/可接受运输条件的建议。对于病毒测试，还必须在标签中注明样本应在症状发作后尽快收集。

### 测试结果的解释

包装说明书中测试结果部分的解释必须列出所有可能的测定输出以及DENV RNA的存在或不存在的确定和测定对照的预期结果。如果内部对照是确定有效的阳性和阴性结果的一部分，则您必须提供每个可能的对照结果的解释以及如何跟踪任何无效或不确定结果的建议。

如果您的测定具有不明确的区域，您必须提供解释并建议如何跟踪不明确的结果。（例如，是否应该报告不明确的结果，还是应重复测试）。如果您将无效或不明确的结果解释为需要重新测试，则必须提供是否应重新测试以及应如何进行重新测试的建议（例如，采用同一患者的相同或不同的样本）。

最终测定结果必须报告为阳性、阴性或不明确（适用时）。根据测试性能或其他器械特定因素，可能需要额外的要求。

## 上市后措施

作为遵循21 CFR第820部分的质量体系法规的良好制造规范的一部分，您必须每年获取并分析上市后数据，以确保您的器械用于检测可能随时间发生进化的不同DENV病毒株和血清型的持续可靠性。如果出现新的DENV病毒株，或者如果在该器械批准时较不常见的DENV变得更加普遍时，这一点尤其重要。上市后数据必须阐述您的器械对于新DENV病毒株的临床性能。

为证明您将如何解决特殊控制的这一方面，您必须提供510（k）的计划，描述您打算如何确保您的器械的性能特性不会随时间发生变化。该计划可能包括在您的器械规定的时间间隔内定期测试高度流行的DENV病毒株。FDA将评价此计划是否有助于缓解器械所带来的风险，从而有助于对该器械的安全性和有效性提供合理保证。

## 参考文献

1. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Procedures for Handling and Processing of Blood Specimens; Approved Guideline; CLSI Document H18-A4 (ISBN 1- 56238-555-0) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
2. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Protocols for Determination of Limits of Detection and limits of Quantitation; Approved guideline; CLSI document EP17-A (ISBN 1- 56238-551-8) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
3. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline; CLSI document EP07-A2 (ISBN 1-56238-584-4) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.
4. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline; CLSI document EP05-A2 (ISBN 1-56238-542-9) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline. CLSI document EP12-A (ISBN 1- 56238-468-6) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2002.
6. Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI). User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline; CLSI document EP15-A2 (ISBN 1-56238- 574-7) CLSI, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2005.

**7**. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Molecular Diagnostic Methods for Infectious Disease; Approved Guideline; CLSI document MM3-A2 [ISBN 1-56238-596- 8] Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2006.

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Assessment of the Clinical Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristics (ROC) Plots; Approved Guideline CLSI document GP10-A. CLSI, Wayne Pennsylvania 1997.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers from Infectious Disease Transmitted by Blood, Body Fluids, and Tissue; CLSI document M29-A. CLSI, Wayne Pennsylvania 1997.
3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Nucleic Acid Sequencing Methods in diagnostic Laboratory Medicine; Approved Guideline; CLSI document MM9-A [ISBN 1-56238-558-5] CLSI, Wayne Pennsylvania 2004.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006. Molecular Diagnostic Methods for Infectious Disease; Approved Guideline. CLSI document MM3-A2 [ISBN 1-56238-596-8] CLSI, Wayne Pennsylvania 2006.

