

## 登革病毒核酸擴增檢驗試劑技術基準

### Guidance for Dengue Virus Nucleic Acid Amplification Test Reagents

107.11.12

#### 【說明】

1. 本指引係「體外診斷醫療器材查驗登記須知」之補充說明，提供醫療器材廠商辦理產品查驗登記，臨床前測試應檢附資料及所須進行項目之建議。本指引未包含臨床評估等其他資料之要求，醫療器材查驗登記申請案仍應符合相關法規之規定。廠商亦應依個案產品結構、材質及宣稱效能提出完整驗證評估（含臨床前測試及/或臨床評估等）之資料。
2. 本指引依據現行之參考資料制定，惟科技發展日新月異，致法規更新恐有未逮處，為確保國人健康安全，審查人員將視產品宣稱之效能、作用原理與設計之安全性及功能性，要求廠商提供本指引所列項目外之驗證評估（含臨床前測試及/或臨床評估）資料；另本指引將不定期更新。
3. 臨床前測試資料應包括檢驗規格（含各測試項目之合格範圍及其制定依據）、方法、原始檢驗紀錄及檢驗成績書。
4. 如製造廠未進行表列測試項目，應檢附相關文獻或科學性評估報告，以證實產品仍具有相等之安全及功能。
5. 各項測試如本指引或表列之參考方法未訂有規格者，由各製造廠自行制定規格；如本指引或表列參考方法已訂有規格，惟製造廠另訂不同規格者，應檢附相關文獻或科學性評估報告以說明訂定該規格之依據。
6. 製造廠使用之測試方法如與本指引所列參考方法不同，但(1)具等同性者，應檢附製造廠測試方法供審核；(2)如不具等同性，應檢附製造廠測試方法及相關文獻或科學性評估報告以說明該測試方法制定之依據。
7. 如表列參考資料有修訂、廢止或被其它標準取代，製造廠得參照新版標準進行測試。

#### 一、本指引適用之醫療器材範圍：

本指引適用於登革病毒（dengue virus）核酸擴增檢驗（nucleic acid amplification test, NAAT）分析。登革病毒核酸擴增檢驗試劑為利用核酸擴增方法，如反轉錄聚合酶鏈鎖反應（RT-PCR）法，從符合輕度或重度之登革熱徵兆與症狀病人的血清與血漿中，偵測是否有登革病毒第 1、2、3 或 4 血清型之 RNA。本指引不適用於登革病毒的血清學分析。

#### 二、本指引適用醫療器材之衛生福利部公告分類分級品項及其鑑別

公告品項：C.9999 其他（others）

鑑別：登革病毒核酸擴增檢驗試劑，含引子、探針、酵素及對照品，利用核酸

擴增檢驗技術，從符合輕度或重度之登革熱徵兆與症狀病人的血清與血漿中，偵測是否有登革病毒第1、2、3或4血清型之RNA。此項檢驗搭配其他臨床與實驗室檢查，有助於臨床實驗室診斷登革病毒感染。

風險等級：第二等級。

### 三、產品之結構、材料、規格、性能、用途、圖樣

1. 預期用途，其內容得包含：檢測標的（如：器材可偵測之登革病毒RNA分子標的），器材是否為自動化，定性測試，用於特定疾病、狀況或風險因子的檢測、定義或判別，檢體種類（如：血清、血漿），受檢族群等。
2. 預期的使用者（如：專業使用者）。
3. 器材的功能及臨床適應症（如：診斷或協助診斷）。
4. 試驗方法（如：傳統聚合酶鏈鎖反應、即時螢光聚合酶鏈鎖反應等）之原理。
5. 試劑可偵測或無法偵測之登革病毒血清型及病毒株。
6. 選擇特定核酸標的(如：特定RNA標的序列、引子與探針) 之理論依據。
7. 器材所有組成及主成分（如：引子、探針、酵素、對照品）之濃度或含量百分比。
8. 檢體（如：血清或血漿）採集、儲存、運送及萃取的材料與方法。
9. 自動化試驗所使用的儀器及其特徵。
10. 所使用軟體之敘述。（若器材包含儀器）
11. 器材的組件，包含各種組合或包裝的完整清單。
12. 配件及使用上所需之相關產品（如：萃取用緩衝液、品管液）。
13. 防止可能造成偽陽性或偽陰性結果的檢驗條件、程序及品管措施。
14. 檢驗結果判讀之說明及其注意事項。

### 四、臨床前測試

項目	規格、需求及/或應進行測試	參考指引或採認標準
----	---------------	-----------

<p>1. 方法比較 (Method Comparison)</p>	<p>與國內核准上市或美國、日本、加拿大、瑞士及歐盟至少一國核准上市的類似品，或是直接與適當的參考方法（如：傳統RT-PCR方法）比較，來進行此項研究。</p> <p>應使用產品預期適用之檢體進行測試，例如出現登革病毒感染症狀（如：高燒、頭痛、後眼窩痛、肌肉痠痛、關節痛、皮疹、噁心、嘔吐、流鼻血或牙齦出血、容易瘀青、白血球低下等）的患者檢體。若該器材與已上市器材測試結果有差異，應使用其他認定的參考方法再確認測試結果。</p> <p>參考方法應充分分析與確認。若以RT-PCR檢驗法為參考方法，則兩者之引子的序列應不同。序列法需執行雙向定序，且長度至少200 bp。</p>	<p>US FDA Guidance (2014)<sup>2</sup> 第7章</p> <p>CLSI EP09-A2 (2002)<sup>3</sup></p> <p>CLSI EP12-A2 (2008)<sup>4</sup></p>
<p>2. 分析靈敏度 (Analytical Sensitivity)</p>	<p><b>(1) 偵測極限 (Limit of Detection, LoD)</b></p> <p>使用經定量 (pfu/ml) 之病毒培養液，測量登革病毒第1、2、3及4等血清型之偵測極限。</p> <p>上述各血清型活病毒液以登革病毒陰性之人類血清、血漿或相等基質連續稀釋，重複檢測3至5次，95%之病毒偵測率即為病毒LoD。並以該濃度進行額外的至少20次重複測試，證明在95%情況下均可測得病毒，以確認LoD。</p> <p>LoD應以 pfu/ml 以及 RNA 複製數 (copy numbers) 表示。</p> <p><b>(2) 分析反應性 (Analytical reactivity)</b></p> <p>應以經確認型別的四種登革病毒血</p>	<p>US FDA Guidance (2014)<sup>2</sup> 第7章</p> <p>CLSI EP17-A2<sup>5</sup></p>

	<p>清型檢體組 (panel) 進行測試，以確定器材與不同血清型別登革病毒株的反應性。此外，根據案件送審時的臨床及流行病學趨勢，可能還有其他登革病毒株也需納入測試。</p> <p>根據反應性之測試結果，應列舉出此試劑無法檢測之病毒株。</p>	
<p>3. 分析特異性- 交叉反應 (Analytical Specificity-Cross-Reactivity)</p>	<p>應針對可能引發熱病的病原體，評估可能的交叉反應，例如：其他黃病毒屬Flaviviruses (如：黃熱病毒Yellow fever virus、日本腦炎病毒Japanese encephalitis virus、假病毒屬Alphaviruses (如：屈公病毒Chikungunya virus) 及其他引起發燒與發疹症狀之細菌或病毒 (如：麻疹病毒Measles virus、腸病毒Enteroviruses、水痘帶狀疱疹病毒VZV、單純疱疹病毒Herpes simplex viruses) 等，釐清產品在前述病原體存在時的性能特性。</p> <p>微生物應以具有醫學意義的濃度 (通常病毒為<math>10^5</math> pfu/mL，細菌為<math>10^6</math> cfu/mL或更高) 進行測試。</p>	<p>US FDA Guidance (2014)<sup>2</sup> 第7章</p>
<p>4. 分析特異性- 干擾 (Analytical Specificity-Interference)</p>	<p>針對分析方法的特性進行干擾物質研究。可能造成干擾的物質包括、但不限於：基因體DNA、三酸甘油脂、膽固醇、血紅素、膽紅素和白蛋白，以及採血管之抗凝劑 (如：肝素、檸檬酸鈉、EDTA等) 等。</p> <p>在鄰近偵測極限 (LoD) 的濃度進行干擾測試，並以各干擾物質可能的最高濃度進行評估。</p>	<p>US FDA Guidance (2014)<sup>2</sup> 第7章</p> <p>CLSI EP07-A2 (2005)<sup>6</sup></p>
<p>5. 交互反應 (Carry-Over and Cross-contamination)</p>	<p>交互使用高陽性與高陰性檢體進行至少5次測試及以高陰性檢體檢測結果為陰性的比率是否高於95%，評估是否有交互反應的情況。</p>	<p>US FDA Guidance (2014)<sup>2</sup> 第7章</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 「高陰性 (high negative)」檢體：檢體的分析物濃度低於閾值且重複檢驗的結果約有95%的機率為陰性。</li> <li>● 「高陽性 (high positive)」檢體：檢體的分析物濃度超過預期使用族群之患者檢體檢測結果的95%或以上。</li> </ul>	
<p>6. 精密度 (Precision)</p>	<p><b>(1) 重複性 (Repeatability)</b></p> <p>針對變異的來源進行測試，例如：不同操作者、不同天及不同次操作 (run)。至少測試12天 (不需為連續)，每天進行2次操作，每次操作重複檢驗每件檢體2次。若校正週期少於2個月，則時程應橫跨至少兩個校正週期。</p> <p>測試檢體組應包含以下每一種(如欲以代表性病毒株測試結果替代，應提供其適用性評估資料)病毒濃度至少各1株以上：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 「陰性」檢體：檢體的分析物濃度低於臨床閾值 (cut-off)，且該檢體重複檢驗的結果皆為陰性。</li> <li>● 「高陰性 (high negative) / 低陽性 (low positive)」檢體 (C<sub>20</sub>-C<sub>80</sub>): 檢體的分析物濃度僅略低於臨床閾值 (cut-off)，故該檢體重複檢驗的結果約有20-80%的機率為陰性。</li> <li>● 「低陽性 (low positive)」檢體：檢體的分析物濃度略高於臨床閾值，且該檢體重複檢驗的結果約有95%的機率為陽性。</li> </ul>	<p>US FDA Guidance (2014)<sup>2</sup> 第7章</p> <p>CLSI EP05-A2 (2006)<sup>7</sup></p> <p>CLSI EP12-A2 (2008)<sup>4</sup></p> <p>CLSI EP15-A2 (2006)<sup>8</sup></p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 「陽性」檢體：檢體的分析物濃度高於臨床閾值濃度，且可預期100%的機率均為陽性。</li> </ul> <p><b>(2) 再現性 (Reproducibility)</b></p> <p>在3個地點，其中應包括足以代表產品最終檢驗環境的地點（如：臨床實驗室）進行測試至少5天，每天至少進行2次操作，每次操作重複檢驗每件檢體3次。每天至少由該地點的2名操作者進行檢驗。使用與(1)重複性試驗之相同檢體組。</p>	
<p>7. 品管 (Controls)</p>	<p>(1) 陰性品管：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 空白或無分析物的品管： 包含緩衝液或檢體運送培養基，以及除核酸外之所有試劑組成成分。其用以排除目標分析物核酸污染，或擴增反應之背景增加。</li> <li>● 陰性檢體品管： 含非目標分析物核酸，或若用於評估萃取程序，則含有完整生物體（除登革病毒外）。其表示在缺乏分析物序列的情況下，不會出現訊號。</li> </ul> <p>(2) 陽性品管：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 完整分析程序之陽性品管： 含目標分析物核酸，用於管控RNA萃取、擴增與偵測等整個分析程序。其模擬患者檢體，與患者檢體同時進行檢測。</li> </ul>	

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 擴增／偵測之陽性品管： 含純化的目標分析物核酸，其濃度為定性分析法之偵測極限或接近偵測極限。用以表示若檢體內含目標分析物質，可偵測到該物質。</li> </ul> <p>(3) 內部品管：</p> <p>內部品管為與目標分析物核酸共同萃取與擴增之非分析物核酸序列。其用以管控試劑（如：聚合酶、引子等）完整性、所用設備功能以及檢體內是否含有擴增抑制物。</p>	
8. 核酸萃取 ( Nucleic Acid Extraction)	<p>Acid</p> <p>評估所選用或建議的各種萃取方法對產品性能之影響。同時使用建議之完整分析程序（包括萃取程序），評估產品之分析與臨床性能特性，包含以各萃取方法執行產品之偵測極限及再現性。</p>	US FDA Guidance (2014) <sup>2</sup> 第7章
9. 閾值 (Cut-off)	<p>說明決定閾值（cut-off）的方法。可以臨床檢體先導研究（pilot study）的Receiver Operating Curve（ROC）分析所得到之相關靈敏度及相關特異性判斷，並以預期受檢族群加以確認。若分析法含不確定區段，應說明如何決定此區段之上下限值。</p>	US FDA Guidance (2014) <sup>2</sup> 第7章 CLSI EP24-A2 (2011) <sup>9</sup>
10. 檢體採集及處理 ( Specimen Collection and Handling)	<p>(1) 檢體採集</p> <p>應說明產品使用的檢體類型。若可使用血清以外的檢體類型（如：含EDTA或肝素鈉血漿），則應提供資訊證明這些抗凝劑對檢驗沒有顯著影響。</p> <p>(2) 檢體保存</p>	US FDA Guidance (2014) <sup>2</sup> 第7章

	應提供文件或參考依據以證明仿單所宣稱的檢體保存條件（如：保存溫度、可接受的冷凍/解凍循環次數等）與保存期間。	
11. 安定性 (Stability)	應提供器材於宣稱之儲存條件下的開封前、後之安定性評估資料。	CLSI EP25-A (2009) <sup>10</sup>  ISO 23640 (2011) <sup>11</sup>
12. 標示 (Labeling)	<p>參照本署「體外診斷醫療器材中文仿單編寫原則」。</p> <p>考量器材特性，建議加註相關警語，例如：</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>● 本器材只可針對臨床症狀符合登革熱或登革出血熱的患者進行檢驗。</li> <li>● 判讀檢驗結果時，應參考其他實驗室檢查結果及患者整體臨床症狀。</li> <li>● 謹慎判讀免疫抑制患者之檢測結果。</li> <li>● 陰性檢驗結果無法排除登革病毒感染，不可作為診斷或治療之唯一依據。開始發燒後3至6天採集之陰性檢體應以抗登革病毒IgM檢測法重新檢測，以增加正確診斷感染登革病毒之機率。</li> <li>● 未正確採集、運送或處理檢體可能會造成偽陰性結果。檢體內含有擴增抑制劑或檢體內生物含量不足，也可能造成偽陰性結果。</li> <li>● 本器材無法排除其他細菌或病毒性病原體造成之疾病。</li> </ul>	體外診斷醫療器材中文仿單編寫原則 <sup>12</sup>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>● 本器材不可用於新生兒臍帶血檢測、產前篩檢，也不可用於未出現符合登革熱症狀的一般群體進行篩檢。</li> </ul>	
--	--	--

## 五、參考文獻

1. 體外診斷醫療器材查驗登記須知 (2017)
2. US FDA Guidance for Industry and FDA Staff Class II Special Controls Guideline: Dengue Virus Nucleic Acid Amplification Test Reagents. (2014)
3. CLSI EP09-A3, Measurement Procedure Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline - Third Edition. (2013)
4. CLSI EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline - Second Edition. (2008)
5. CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. (2012)
6. CLSI EP07-A2, Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline - Second Edition. (2005)
7. CLSI EP05-A2, Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline - Second Edition. (2006)
8. CLSI EP15-A2, User Verification of Performance for Precision and Trueness; Approved Guideline - Second Edition. (2006)
9. CLSI EP24-A2, Assessment of the Diagnostic Accuracy of Laboratory Tests Using Receiver Operating Characteristic Curves; Approved Guideline - Second Edition. (2011)
10. CLSI EP25-A, Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents. (2009)
11. ISO 23640, In vitro diagnostic medical devices -- Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents. (2011)
12. 體外診斷醫療器材中文仿單編寫原則(2015)