

呼吸道病毒多標的核酸檢驗試劑技術基準

Guidance for Respiratory Viral Panel Multiplex Nucleic Acid Assays

111.11.28

【說明】

1. 本基準係「體外診斷醫療器材查驗登記須知」之補充說明，提供醫療器材業者辦理產品查驗登記，臨床前測試應檢附資料及所須進行項目之建議。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. 本基準依據現行之參考資料訂定，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，要求廠商提供本基準所列項目外之驗證評估（含臨床前測試及/或臨床評估）資料；另本基準將不定期更新。
3. 各項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. 如製造業者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效能。
5. 各項測試如本基準或表列之參考方法未訂有規格者，由各製造業者自行訂定規格；如本基準或表列參考方法已訂有規格，惟製造業者另訂不同規格者，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. 製造業者使用之測試方法如與本基準所列參考方法不同，但（1）具等同性者，應檢附製造業者測試方法供審核；（2）如不具等同性，應檢附製造業者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訂定之依據。
7. 如表列參考資料有修訂、廢止或被其它標準取代，製造業者得參照新版標準進行測試。

一、本基準適用之醫療器材範圍：

本基準適用於利用聚合酶連鎖反應或其他分子生物學方法，以特定的呼吸道病毒基因序列為檢測目標，對鼻咽拭子、痰液、呼吸道沖洗液、呼吸道抽取液或其他呼吸道分泌物檢體中的呼吸道病毒核酸進行體外定性檢測。本基準不適用於作為診斷唯一依據的檢測法，亦不適用於作為鑑別診斷病毒與非病毒感染的檢測法。

二、本基準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.3980 呼吸道病毒多標的核酸檢驗試劑（Respiratory viral panel multiplex nucleic acid assay）

鑑別：呼吸道病毒多標的核酸檢驗試劑為定性體外診斷醫療器材，用以同時檢測和識別自人類呼吸道取樣或病毒培養之多種病毒核酸。此器材配合使用其他臨床和實驗室研究結果，用以檢測與識別特定病毒核酸。此器材可適用於檢測和鑑定以下病毒：

- (1) A型及B型流感（Influenza A and Influenza B）；
- (2) A型流感H1亞型、和A型流感H3亞型（Influenza A subtype H1 and Influenza A subtype H3）；
- (3) 呼吸道融合瘤病毒（RSV）A亞型、和呼吸道融合瘤病毒（RSV）B亞型（Respiratory Syncytial Virus subtype A and Respiratory Syncytial Virus subtype B）；
- (4) 副流感1型、副流感2型、和副流感3型病毒（Parainfluenza 1, Parainfluenza 2 and Parainfluenza 3 virus）；
- (5) 人類偏肺病毒（Human Metapneumovirus）；
- (6) 鼻病毒（Rhinovirus）；
- (7) 腺病毒（Adenovirus）。

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：鑑定之病毒型別及/或亞型，檢測標的（如：RNA、DNA），器材是否為自動化，定性，檢體種類，特定疾病、狀況或風險因子的檢測、定義或判別，受檢族群，預期的使用者（專業使用者）等。
2. 器材的功能（如：協助診斷）。
3. 檢測方法學，包括：器材技術原理、核酸分離／純化之方法與原理、檢測儀器（如：RT-PCR或磁珠陣列）分析特徵、探針對偵測特定呼吸道病毒序列之特異性、目標序列及引子與探針的序列特徵、方法限制（如：雜交反應的飽和程度、最大週期數）、降低交叉汙染的設計等。
4. 器材所有組成及主成分（如：引子、探針、酵素、品管物）濃度或含量百

分比。

5. 檢體採集部位、類型（如：拭子、抽吸物或病毒培養液）與其運送、處理及保存的材料、方法與保存時間。
6. 品管液之描述，包含陰性品管、陽性品管及內部品管。
7. 器材的組件及各種組合或包裝的完整清單。
8. 配件及其他配合使用之相關產品（如：緩衝液、螢光染劑、化學冷光試劑、其他訊號傳遞／擴增試劑）。
9. 搭配使用之檢測儀器、型號、規格特徵及其所使用軟體之敘述。
10. 檢驗結果判讀之說明及其注意事項。
11. 檢驗方法的侷限性，防止可能造成偽陽性或偽陰性結果的檢驗條件、程序、品管措施及干擾物質（如：常見口、鼻咽治療藥物、食物、清潔用品）。

四、性能評估測試

項目	規格、需求及/或應進行測試	參考指引或採認標準
1. 方法比較 (Method Comparison)	<p>在足以代表產品最終檢驗環境的地點（如：臨床實驗室）至少三處進行方法比較研究，並由該地點的專業人員進行試驗。</p> <p>與國內核准上市或美國、日本、加拿大、瑞士、澳洲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，進行此項研究。參考方法應充分分析與確認，其可為一項以上檢驗的結果組合而成（如：病毒分離培養、病毒核酸定序）。</p> <p>若以病毒培養法為參考方法，後續需使用具病毒型別特異性之抗體或PCR方法進行鑑定，以確認病毒型別。</p> <p>若以病毒核酸定序作為參考方法，引子所擴增之核酸片段不得為器材所</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p> <p>檢測試劑註冊技術審查指導原則 (2019)⁴</p>

	<p>偵測之區域，可提供文獻或評估報告說明使用引子之合適性。擴增片段（amplicon）需執行雙向定序，並證明取得之序列含有至少200 bp品質合格之鹼基對（如以PHRED或類似軟體測量之品質分數等於或高於40），且與參考或保守序列相同。</p> <p>使用產品宣稱之適用受檢族群或出現呼吸道感染症狀的患者檢體並包含所有宣稱適用之檢體採集器材，另應提供樣本數計算方法及其參考依據。每個年齡層應取得具代表性的陽性檢體，均利用參考方法檢測結果的正確性。若使用冷凍檢體，應評估可重複冷凍解凍之次數。</p> <p>進行研究時，應提供所宣稱可偵測的呼吸道病毒型別之靈敏度與特异性，或陽性與陰性一致率結果。</p> <p>一般而言，陽性一致率應$\geq 90\%$，其95%信賴區間下限應$\geq 80\%$；陰性一致率其95%信賴區間下限應$\geq 90\%$。惟仍需視產品特性及檢測標的評估。</p>	
<p>2. 核酸萃取/純化 (Nucleic Acid Extraction/Purification)</p>	<p>針對選擇的萃取/純化方法對於所宣稱呼吸道病毒型別的偵測極限及再現性進行評估。</p> <p>若檢驗試劑中，不包含核酸萃取/純化的組成，應針對所配合使用核酸萃取/純化試劑組共同進行評估。</p> <p>如宣稱多種檢體種類、多種萃取方法，應分別執行臨床前測試（偵測極限及再現性），並提供核酸品質評估結果（如：使用內部品管物）。</p> <p>使用自動化核酸萃取系統進行檢體前處理，需進行自動核酸萃取系統之各反應槽交叉汙染可能性評估。可以</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p>

	<p>空白品管圍繞含有最高預期臨床濃度之核酸檢體進行萃取以證實各反應槽間無交叉汙染。</p>	
<p>3. 品管 (Quality Control)</p>	<p>適當執行以下品管，以確認產品性能的完整過程，包括檢體前處理、核酸平行萃取/純化和檢測過程：</p> <p>(1) 陰性品管：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 空白品管：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。其用以排除標的核酸汙染，或增幅反應之背景增加。 ● 陰性檢體品管：含有非標的核酸，或若是用以評估萃取步驟，則含有整個有機體。其表示在沒有標的序列（sequence）存在的情況下，不會出現訊號。 <p>(2) 陽性品管：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 完整分析程序之陽性品管：含有標的核酸，用於管控萃取、增幅及偵測等整個分析程序。此類陽性品管包含加入感染非致病性病毒株之細胞株之人類陰性檢體或模擬檢體。 ● 增幅／偵測之陽性品管：含純化的標的核酸，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標的分析物質，可偵測到該物質。 <p>(3) 內部品管：含有非標的之核酸序列，與標的核酸共同萃取及增幅反應。其用以管控試劑（如：聚合酶、引子等）完整性、所用設</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p>

	備功能（如：熱循環儀）以及檢體內是否含有增幅抑制物。	
4. 分析反應性 (Analytical Reactivity)	<p>針對所宣稱呼吸道病毒型別進行分析反應性的試驗。</p> <p>若目標分析物含流感病毒，應以可偵測包括具有時間和區域特徵且接近偵測極限濃度的至少10株病毒株進行分析。A型應包括H1、H3、H5、H7等亞型，B型應包括Victoria、Yamagata基因群。若有包含疫苗株，則應包括近期流感季節之病毒株。</p> <p>若目標分析物含腺病毒（Adenovirus），建議偵測包括1、2、3、4、5、6、7、14、21、55等易造成呼吸道感染之基因亞型。</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p> <p>檢測試劑註冊技術審查指導原則 (2019)⁴</p>
5. 偵測極限 (Limit of Detection, LoD)	<p>針對所宣稱可偵測的呼吸道病毒型別至少各2株病毒株，以適當基質進行系列稀釋，每個病毒稀釋液重複3-5份，將具有95%陽性結果的濃度作為偵測極限。並以製備20個偵測極限濃度的病毒稀釋液進行驗證，證實於此偵測極限濃度時，會有95%以上的陽性結果。</p> <p>病毒在稀釋時，至少以最常使用或最難檢測之臨床檢體做為基質。基質可以病毒檢測陰性之人類同一類型之呼吸道檢體之集合檢體（pooled specimens，如NP pools）製備。若選用病毒運送培養基或其他模擬基質，應證實其分析性能可等同於臨床檢體。</p> <p>決定病毒濃度的參考方法建議可用半數組織培養感染量（tissue culture infective dose 50, TCID50）或斑點形成單位（plaque forming units/mL，PFU/mL）。</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p> <p>檢測試劑註冊技術審查指導原則 (2019)⁴</p> <p>US FDA Guidance (2011)⁵</p> <p>CLSI EP17-A2 (2012)⁶</p>

<p>6. 分析特異性-交叉反應 (Analytical Specificity-Cross-Reactivity)</p>	<p>提供所宣稱可檢測病毒及亞型間交叉反應測試結果，以確認所宣稱可檢測之分析物之間無交叉反應性。</p> <p>另針對易引起相似臨床症狀的病原體評估可能的交叉反應，例如： Cytomegalovirus、Herpes simplex virus Type 1、Varicella-zoster virus、Enterovirus、Epstein Barr Virus、Human Coronavirus (HKU1、229E、OC43、NL63、SARS-CoV、SARS-CoV-2)、Measles、Mumps Virus、<i>Bordetella pertussis</i>、<i>Chlamydia pneumoniae</i>、<i>Corynebacterium sp.</i>、<i>Escherichia coli</i>、<i>Hemophilus influenzae</i>、<i>Lactobacillus sp.</i>、<i>Legionella sp</i>、<i>Moraxella catarrhalis</i>、<i>Mycobacterium tuberculosis (avirulent)</i>、<i>Mycoplasma pneumoniae</i>、<i>Neisseria meningitides</i>、<i>Neisseria sp.</i>、<i>Pseudomonas aeruginosa</i>、<i>Staphylococcus aureus (Protein A producer)</i>、<i>Staphylococcus epidermidis</i>、<i>Streptococcus pneumoniae</i>、<i>Streptococcus pyogenes</i>、<i>Streptococcus salivarius</i>。</p> <p>對於交叉反應濃度，以具有醫學意義的病毒濃度(通常為10^5 PFU/mL或更高)、細菌濃度(通常為10^6 CFU/mL或更高)進行測試。</p>	
<p>7. 競爭抑制研究 (Competitive Inhibition Studies)</p>	<p>針對所宣稱的呼吸道病毒在共同感染情況下(如：A型流感病毒與呼吸道融合病毒)，高濃度目標分析物對於低濃度目標分析物的影響。</p> <p>建議使用一低濃度目標分析物(如：小於3倍偵測極限濃度)與另一高濃度目標分析物進行此項研究，每項組合至少3重複檢驗，以評估可能的競爭抑制情形。</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p> <p>Molecular Diagnostic Template</p>

	競爭抑制研究可與偵測極限或再現性同時進行。	(2020) ⁷
8. 分析特異性-干擾 (Analytical Specificity-Interference)	<p>針對潛在干擾物質進行研究。針對呼吸道檢體可能造成干擾的物質包括、但不限於：粘蛋白、人類血液、鼻腔噴霧劑或滴劑、鼻用皮質類固醇、鼻用凝膠、緩解過敏性症狀藥物、潤喉片、口服麻醉劑和鎮痛劑、抗病毒藥物、抗生素、鼻用軟膏、全身抗菌藥等。</p> <p>應使用所宣稱呼吸道病毒型別濃度近臨床閾值的檢體來進行干擾評估，並評估各干擾物質於其不受明顯干擾可能的最高濃度。</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p> <p>檢測試劑註冊技術審查指導原則 (2019)⁴</p> <p>CLSI EP07 (2018)⁸</p>
9. 閾值 (Cut-off)	<p>說明決定各標的物閾值 (cut-off) 的方法。</p> <p>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。若分析法含有不確定區段 (equivocal zone) 應加以說明定義。</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p>
10. 精密度/再現性 (Precision/Reproducibility)	<p>針對可能會影響最後檢驗結果的變異來源，包含分析前的處理步驟 (如：核酸萃取)、分析儀、操作者、批次、不同次操作、不同天操作、實驗室等，進行分析內 (intra-assay)、分析間 (inter-assay)、批次間 (inter-lot) 及實驗室間的精密度研究。</p> <p>有關實驗室間再現性，應在代表預期使用者的3處地點進行測試3至5天 (無需為連續)，每天至少進行2次操作，每次操作每件檢體2次重複檢驗，以及每天至少由2名操作者進行重複檢驗。</p>	<p>US FDA Guidance (2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p> <p>檢測試劑註冊技術審查指導原則 (2019)⁴</p> <p>CLSI EP12-A2 (2008)⁹</p> <p>CLSI EP05-A3</p>

	<p>至少包括所宣稱呼吸道病毒型別以臨床陰性檢體為基質製備的3種濃度進行測試：</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 「高陰性 (high negative)」檢體：檢體的分析物濃度略低於臨床閾值，且該檢體重複檢驗的結果約有95%的機率為陰性，5%的機率為陽性。 ● 「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，5%的機率為陰性。 ● 「中等陽性 (moderate positive)」檢體：檢體的分析物濃度約為臨床閾值濃度的2至3倍，且100%的機率均為陽性。 	(2014) ¹⁰
<p>11. 殘留汙染及交叉汙染 (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，以高陰性檢體檢測結果為陰性的比率是否高於95%評估是否有交叉汙染的情況。</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 「高陰性 (high negative)」檢體：檢體的分析物濃度略低於臨床閾值，且該檢體重複檢驗的結果約有95%的機率為陰性，5%的機率為陽性。 ● 「高陽性 (high positive)」檢體：檢體的分析物濃度夠高到超過95%或以上預期使用族群患者檢體檢測結果。 	<p>US FDA Guidance (2009)² US FDA Guidance (2009)³</p>
<p>12. 檢體保存及運送</p>	<p>(1) 檢體類別</p>	<p>US FDA Guidance</p>

<p>(Specimen Storage and Shipping)</p>	<p>提供器材宣稱之各項檢體種類評估報告，包含採檢器材之適用性評估。</p> <p>(2) 檢體保存</p> <p>提供評估文件或參考依據以證明所宣稱檢體之保存條件。</p> <p>(3) 檢體運送</p> <p>如建議使用檢體運送培養基，應針對該培養基進行評估。</p>	<p>(2009)²</p> <p>US FDA Guidance (2009)³</p>
<p>13. 安定性 (Stability)</p>	<p>參照本署「體外診斷醫療器材安定性評估技術基準」。</p> <p>提供器材的有效期間及其於宣稱之儲存條件下的開封前、後之安定性評估資料。</p>	<p>體外診斷醫療器材安定性評估技術基準 (2021)¹¹</p> <p>CLSI EP25-A (2009)¹²</p> <p>ISO 23640 (2011)¹³</p>
<p>14. 軟體驗證文件 (Software Validation Documentation)</p>	<p>參照本署「醫療器材軟體確效指引」。</p> <p>依搭配系統軟體影響等級 (Level of Concern) ，檢附其軟體驗證文件。</p>	<p>醫療器材軟體確效指引 (2017)¹⁴</p> <p>IEC 62304 (2015)¹⁵</p>
<p>15. 標示 (Labeling)</p>	<p>參照本署「體外診斷醫療器材中文說明書編寫原則」。</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"> ● 檢測標的 (病毒序列) 可能持續存在於體內，不論是否具有活性。偵測到標的物不表示相對應的病毒為具感染性的或是引起臨床症狀之病原。 ● 不當的檢體採集、處理、轉、運送、保存和萃取，均 	<p>體外診斷醫療器材中文說明書編寫原則 (2021)¹⁶</p>

	<p>有可能導致不正確的結果。</p> <ul style="list-style-type: none"> ● 試驗有產生偽陽性數值的風險，可能來自目標有機體的交叉汙染及檢測中非特异性信號。 ● 試驗有產生偽陰性數值的風險，可能來自不當的收集、運輸或處理的核酸檢體、標的病毒序列存在變異、測試步驟錯誤、檢體中有增幅反應抑制物、或待測物量太少等。 	
--	---	--

五、參考文獻

1. 食品藥物管理署。體外診斷醫療器材查驗登記須知。(2021)
2. US FDA. Respiratory Viral Panel Multiplex Nucleic Acid Assay - Class II Special Controls Guidance for Industry and FDA Staff. (2009)
3. US FDA. Class II Special Controls Guidance Document: Testing for Detection and Differentiation of Influenza A Virus Subtypes Using Multiplex Assays. (2009)
4. 中國國家藥品監督管理局。呼吸道病毒多重核酸檢測試劑註冊技術審查指導原則。(2019)
5. US FDA. Establishing the Performance Characteristics of In Vitro Diagnostic Devices for the Detection or Detection and Differentiation of Influenza Viruses. (2011)
6. CLSI EP17-A2, Evaluation of Detection Capability for Clinical Laboratory Measurement Procedures; Approved Guideline - Second Edition. (2012)
7. US FDA. Molecular Diagnostic Template for Commercial Manufacturers. (2020)
8. CLSI EP07, Interference Testing in Clinical Chemistry - Third Edition. (2018)
9. CLSI EP12-A2, User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline - Second Edition. (2008)
10. CLSI EP05-A3, Evaluation of Precision of Quantitative Measurement Procedures; Approved Guideline - Third Edition. (2014)

11. 食品藥物管理署。體外診斷醫療器材安定性評估技術基準 (2021)
12. CLSI EP25-A, Evaluation of Stability of In Vitro Diagnostic Reagents. (2009)
13. ISO 23640, In vitro diagnostic medical devices -- Evaluation of stability of in vitro diagnostic reagents. (2011)
14. 食品藥物管理署。醫療器材軟體確效指引。(2017)
15. IEC 62304:2006+A1:2015, Medical device software - Software life cycle processes. (2015)
16. 食品藥物管理署。體外診斷醫療器材中文說明書編寫原則。(2021)