**行业与食品药品监督管理局工作人员指南草案**

***确定用于检测艰难梭菌的体外诊断器械的
性能特性***

***指南草案***

**本指导性文件仅供评论之用。**

**发布日期：2010年11月29日**

贵公司可以随时提交书面评论和建议至食品药品监督管理局，文件管理部（5630 Fishers Lane，rm。1061，（HFA-305），Rockville，MD，20852），供部门审议。电子评论请提交至[http：//www.regulations.gov](http://www.regulations.gov/)。所有评论应注明文档编号，该编号位于宣布提供指南的联邦公报通告中。

有关本文件的问题，请联系Stephen Lovell ，电话：301-796-6968或电子邮件：Stephen.Lovell@fda.hhs.gov。

**定稿时，本文件将取代1990年5月31日发布的“用于评估旨在辅助诊断艰难梭菌相关疾病的实验室试验的评审标准”。**

**美国卫生及公众服务部**

**食品药品监督管理局**

**器械与放射健康中心**

**体外诊断和放射健康办公室**

**微生物学器械部**

**前言**

**其他副本**

其他副本可从互联网获得，网址为：http：//www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/uc m234868.htm。贵公司还可以向dsmica@fda.hhs.gov发送电子邮件请求，以接收本指南的电子副本，或向301-827-8149发送传真请求以接收打印件。请使用文件编号1715来标识贵公司所要求获得的指南。

**目录**

[I. 引言 4](#_Toc479621632)

[II. 背景 5](#_Toc479621633)

[III. 范围 5](#_Toc479621634)

[IV. 健康风险 6](#_Toc479621635)

[V. 确定性能特性 7](#_Toc479621636)

[A. 一般建议 8](#_Toc479621637)

[B. 对照 8](#_Toc479621638)

[C. 分析研究 8](#_Toc479621639)

[D. 临床性能研究 16](#_Toc479621640)

[E. 携带和交叉污染研究（用于需要工具的多样本测定和器械） 18](#_Toc479621641)

[G. CLIA 豁免 20](#_Toc479621642)

[VI. 参考文件 21](#_Toc479621643)

**行业和食品药品监督管理局工作人员
指南草案**

**确定用于检测艰难梭菌的体外诊断器械的性能特性**

***本指南草案定稿时，将体现食品与药物管理局（FDA）在这一主题上的最新见解。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。***

# 引言

FDA拟发布本指南草案，以为行业和本审查机构工作人员提供关于为旨在用于检测艰难梭菌（艰难梭菌）的各种类型的体外诊断器械（IVD）的提交510（k）的最新建议。本文件是1990年5月31日发布的“用于评估旨在辅助诊断艰难梭菌相关疾病的实验室检查的审批标准”的修订版。其更新的目的在于纳入自1990年指南发布以来确定的新问题和技术。此类方法包括检测艰难梭菌核酸（例如，通过核酸扩增（NAAT）方法（如实时聚合酶链反应（RT-PCR）技术）检测艰难梭菌毒素B基因）。

食品药品监督管理局的指导性文件，包括本指南，不构成法律上可强制执行的责任。相反，指南说明本审查机构目前关于某一主题的见解，除非引用具体的监管或法定要求，否则应仅视为建议。在本审查机构指南中使用词语“应”是指建议或推荐进行某一事项，但非强制要求。

# 背景

本文件对用于确定检测人类样本中的艰难梭菌细菌的体外诊断器械的性能特性的研究提供建议。食品药品监督管理局认为此类推荐研究将与特定试验可能需要的I类和II类上市前申报（例如510（k）或重新分类申请）相关。

拟销售用于检测人类样本中的艰难梭菌细菌的体外诊断器械的制造商应当遵守联邦食品、药品和化妆品法案（FD＆C Act）的一般控制。此外，除非获得豁免，否则其必须在销售器械之前获得上市前许可或批准（该法案第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，例如“上市前通告（510k）”，其网址为：http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/HowtoMarketYourDevi ce / PremarketSubmissions / PremarketNotification510k / default.htm。有关缩略型和传统型510（k）的内容和格式的指南可以在标题为“传统型和缩略型510（k）的格式”的指南中找到，其网址为：http://www.fda.gov/MedicalDevices /DeviceRegulationandGuidance / GuidanceDocuments / uc m084365.htm。

# 范围

受本指南制约的检测方法包括使用粪便样本的抗原、抗体和核酸试验。本文件的范围限于现有分类中所述的器械，如下所示，并且可适用于不属于这些现有分类的其它艰难梭菌诊断器械。这些其他器械可以包括将受制于根据该法案（“重新分类”）的第513（f）（2）节提出的初始分类申请的器械，以及尝试确定与未来重新批准的器械的实质等同性的后续器械。

以下是现有的艰难梭菌IVD分类法规：

**21 CFR 866.2660微生物分化与鉴定器械**

1. 标识。微生物分化和鉴定器械是用于医疗目的的器械，其由一种或多种组件组成，例如差别培养基、生物化学试剂和试验试剂浸渍的纸片或纸条，此类试剂通常包含在单独隔室中并且用于分化和鉴定所选微生物。该器械有助于诊断疾病。
2. 分类。I类（一般控制）。根据第866.9节的规定，该器械不受本章第807部分子部分E中的上市前通告程序限制。

以下是根据21 CFR 866.2660批准的艰难梭菌器械的产品代码：

LLH - 艰难梭菌，抗原组件（I类）

MCB - 抗原，艰难梭菌（I类）

OMN-艰难梭菌核酸扩增试验测定（I类）

因此，贵公司的申报文件中应提供以下信息：

* 器械的诊断标识物（抗原、抗体或核酸）
* 器械的方法或试验原理（例如，免疫测定、RT-PCR等）
* 样本制备方法
* 报告结果所需的时间长度（例如，在开始试验后6-24小时内等）

# 健康风险

艰难梭菌是一种革兰氏阳性、厌氧、孢子形成杆（杆菌）细菌[参考文件：1]，其是抗生素相关性腹泻（AAD）的常见原因。艰难梭菌定植是出现伪膜性结肠炎的最重要原因[参考文件：2]，该疾病是结肠受到严重感染的结果，其通常发生在正常肠道菌群因使用抗生素被根除后。肠道菌群的减少可使艰难梭菌细菌过度生长，这是因为缺乏来自其他微生物对营养物的任何竞争性抑制。艰难梭菌的过度生长可造成一定伤害，因为致病菌株可释放毒素（肠毒素（毒素A）和细胞毒素（毒素B））[参考文件：3]。这些毒素是感染患者中出现腹泻和炎症的原因，尽管研究者对其相对影响也未有准确定义。本指南也已对另一种毒素（二元毒素）进行了说明，但其在疾病中的作用尚未完全了解。艰难梭菌对大多数抗生素具有抗性，并且可通过停止无反应性治疗并开始特异性抗梭菌抗生素（例如甲硝唑或万古霉素）治疗。

其可通过粪便口服途径在人与人之间传播。因为此类微生物可形成耐热孢子，所以其可以长期保留在医院或疗养院环境中。其可以在医院的几乎任何表面上生长。一旦孢子被摄入，因其耐酸性，可通过胃而不受伤害。其在结肠转变为活跃状态并进行繁殖。

通常用于医院中的感染控制的几种消毒剂无法杀死该细菌，并且实际上可能促进孢子形成。然而，含有漂白剂的消毒剂可有效杀死该微生物。[参考文件：4]。

用于检测艰难梭菌的方法包括用于鉴定毒素的细胞毒性测定、酶联免疫吸附测定（ELISA）以及核酸测定。1如果用于检测艰难梭菌的器械未能按预期发挥性能或未能正确解释结果，则可导致患者管理决策不正确。在管理个体患者的情况下，假阴性报告可能导致在提供（或未能提供）明确诊断、适当治疗、感染控制和预防措施的方面出现延迟。假阳性报告可能导致进行不必要或不适当的治疗或采用不必要的控制和预防措施。因此，确定这些器械的性能并了解与使用这些器械相关的风险对于其安全有效使用来说至关重要。

制造商进行的、用于确定艰难梭菌检测器械性能的研究是确定这些器械的安全性和有效性或实质等同性的基础。我们建议使用细胞毒性测定作为验证试验​​。该测定可检测因可以用特异性抗血清中和的细胞培养物中的毒素细胞病变效应而产生的艰难梭菌毒素。

# 确定性能特性

我们建议贵公司提供研究方案的副本。这些方案应包括关于排除和入选标准、研究中使用的比较方法、样本的类型和数量、使用说明和科学可靠的统计分析计划的信息。这些方案将使我们能够更好地解读贵公司的数据，从而加快审核贵公司的申报文件。

当提到临床实验室标准研究所（CLSI）标准或指南时，我们建议贵公司指明遵循了标准或指南的哪些具体方面。此外，贵公司应该指出是否修改了标准的任何部分并对这些修改进行说明。

我们鼓励发起人联系微生物学器械部以讨论其拟定研究和样本类型的选择。其被称为预IDE过程。如果制造商难以获得样本，我们特别鼓励其寻求这种类型的讨论。

1其他检测方法包括：a。微生物培养和b。检测艰难梭菌的常见抗原（如谷氨酸脱氢酶）但并不区分艰难梭菌的产毒和非产毒性菌株的免疫测定。本指导性文件草案中未提供这些方法。

## 一般建议

我们建议使用细胞毒性测定来确认或排除艰难梭菌感染的诊断。所需阳性或阴性试验的数量取决于这些试验是用于初始诊断（治疗前，用于确认感染）还是用于记录根除（治疗完成后）。基线感染和根除治疗后的定义需要单独考虑（根据所使用的内窥镜试验的数量和类型），因为在基线时，重要的是实现高特异性（低假阳性）以确认感染，在进行治疗试验时，敏感性对于排除感染（低假阴性）来说更为重要。我们已制定了有关感染（或无感染）的定义以辅助发起人基于内窥镜试验来决定哪些患者应被视为感染、未感染或不可评估。重要的是要注意，这些术语的正确定义取决于细胞毒性测定艰难梭菌诊断试验的质量和数量。

## 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。适当外部对照的示例包括先前被表征为艰难梭菌阳性或阴性的临床样本或可商购的阳性和阴性对照。

## 分析研究

抗原表征

贵公司应该将器械中所使用的抗原描述为底物。请简要说明抗原、生物菌株的生产、纯化过程等（贵公司可以将其标为“专有信息”）。如果贵公司使用的抗原是天然抗原，贵公司应该确定其来源，此外，我们建议贵公司提供选择该抗原的理由。

反应临界值的确认

我们建议贵公司说明并解释如何确定贵公司器械的反应临界值的基本原理。如果贵公司提供了临床数据，贵公司应该确定研究中招募和治疗的患者数量、患者人群和用于确定艰难梭菌是否存在以对这些患者进行诊断的方法。数据应以图形方式呈现。

分析灵敏度

*检测限*

我们建议贵公司确定艰难梭菌的检测限（LoD），以计算贵公司的器械的分析灵敏度。研究应包括至少两种毒株的系列稀释，并应包括多种毒素型，其中一种应为毒性型0，并重复进行每次稀释3-5次。LoD定义为提供95％检测率的样本中艰难梭菌的水平。LoD应通过在LoD中额外重复至少20次，并证明在95％的时间内可检测到艰难梭菌来证实。这些额外重复中的每一个应在用器械检测之前分别萃取。LoD的确定（以CFU / mL为单位）应通过实际菌落计数进行。贵公司应该生成对应于20或以上重复次数中的每一次的菌落计数，并且不得依赖于基于原液滴度的估计。

我们建议贵公司参考临床实验室标准研究所（CLSI）文件EP17-A [参考文件：5]。在设计贵公司的研究时，纳入贵公司的LoD研究中的菌株的一些示例在表1中示出。

**表1.建议用于分析敏感性（反应性和LoD）研究的产毒性艰难梭菌菌株**

|  |  |
| --- | --- |
| 菌株 | **毒素型** |
| ATCC 43255 （CCUG19126， VPI 10463） | 0 A+B+ |
| ATCC 9689 （90556-M6S） | 0 A+B+ |
| ATCC 700792 （14797-2） | A+B+ |
| ATCC 17858 （1253） | A+B+ |
| ATCC BAA-1805 | III A+B+ |
| ATCC BAA-1382 （630） | A+B+ |
| ATCC 51695 （BDMS 18 AN） | A+B+ |
| ATCC 43600 （2149） | A+B+ |
| ATCC 43599 （2022） | A+B+ |
| ATCC 43596 （545） | A+B+ |
| ATCC 43594 （W1194） | A+B+ |
| ATCC 17857 （870） | A+B+ |
| ATCC 43598 （1470） | VIII A-B+ |
| CCUG 8864 | X A-B+ |

* + 也可用于可检测常见抗原（如谷氨酸脱氢酶）的器械的LoD研究中的艰难梭菌非产毒性菌株的示例包括：ATCC 700057（VPI 11186）； ATCC 43593； 艰难梭菌Xla（A-B-tox bin +）IS58； 艰难梭菌Xlb（A-B-tox bin +）R1 1402

*分析反应性（包容性）*

我们建议贵公司证明该试验可以检测至少二十种其他产毒性艰难梭菌菌株，其毒素型变异类型不同，代表时间和地理多样性，浓度是LoD浓度的两倍至三倍。如果难以获得足够的样本来证明其可检测特定菌株，贵公司应该联系微生物学器械部以讨论贵公司的研究。进行反应性测试的菌株的多样性应该通过在研究中纳入至少五种不同的毒素型来支持。我们建议用于反应性研究的菌株也选自表1所示的菌株。

分析特异性

*交叉反应性*

我们建议贵公司有关潜在交叉反应性的试验应纳入具有医疗相关水平的病毒和细菌（对于细菌通常为10 6 cfu / ml或更高，而对于病毒则为10 5 pfu / ml或更高）。贵公司应该确认病毒和细菌的特性和滴度。推荐用于交叉反应研究的微生物的示例列于表2中。

**表2.推荐用于分析特异性（交叉反应性）研究的微生物。**

|  |  |
| --- | --- |
| 属与种类 | 菌株 |
| 软弱贫养菌  | ATCC 49176 |
| 鲍氏不动杆菌 | ATCC 19606 |
| 不动杆菌不动杆菌 | CDCF 3697 |
| 嗜水气单胞菌 | ATCC 7966/ CCRI-10071 |
| 产碱假单胞菌 粪便 | ATCC 15554 |
| 四球厌球菌 | ATCC 35098 |
| 蜡状芽孢杆菌 | ATCC 13472 |
| 蜡状芽孢杆菌 | HER 1414 |
| 粪拟杆菌 | ATCC 43185 |
| 屎拟杆菌 | ATCC 43184 |
| 便拟杆菌 | ATCC 43183 |
| 青春双歧杆菌 | ATCC 15703 |
| 长双歧杆菌 | ATCC 15707 |
| 肠杆菌 | ATCC 43479 |
| 空肠弯曲杆菌 | ATCC 33292 |
| 白色念珠菌 | ATCC 10231 |
| 假丝酵母接种 | IDI-1729 |
| 戴氏西地西菌  | ATCC 33431 |
| 砂眼披衣菌 | ABI 08-901-000 |
| 柠檬酸杆菌 | ATCC 25405 |
| 柠檬酸杆菌 | ATCC 8090 |
| 柠檬酸杆菌 | ATCC 27028 |
| 塞氏柠檬酸杆菌  | ATCC 51115 （IDI-2178） |
| 贝氏梭菌 | ATCC 8260 |
| 双歧杆菌 | ATCC 638 |
| 梭状芽孢杆菌 | BAA-613 |
| 肉毒杆菌 | Hall A |
| 丁酸梭菌 | CCRI-11128 |
| 梭菌 | ATCC 11957 |
| 谲诈梭菌 | ATCC 19400 |
| 溶血性梭菌 | ATCC 9650 |
| 溶组织梭菌 | ATCC 19401 |
| 无毒梭菌 | CCRI-9927 / IDI 1986 |
| 甲基硬脂酸梭菌 | ATCC 43829 |
| 梭菌梭菌 | ATCC 27757 |
| 氏梭状芽胞杆菌 | ATCC 19402 |
| 梭状芽孢杆菌 | ATCC 49531 |
| 类腐败梭菌 | ATCC 25780 |
| 产气荚膜梭菌 | ATCC 13124 |
| 梭状芽孢杆菌 | ATCC 25582 |
| 梭状芽胞杆菌 | ATCC 35704 |
| 败血性梭菌 | ATCC 12464 |
| 索氏梭菌  | ATCC 9714 |

|  |  |
| --- | --- |
| 属与种类 | 菌株 |
| *艰难梭菌* | （non-toxigenic ATCC 43593） |
| *艰难梭菌* | （non-toxigenic ATCC 43601） |
| *楔状杆菌* | ATCC 19403 |
| *梭状芽孢杆菌* | ATCC 29899 |
| *产孢梭菌* | ATCC 15579 |
| *共生梭菌* | CCRI-9928 /IDI 1989 |
| *共生梭菌* | ATCC 14940 |
| *梭菌* | ATCC 14573 |
| *破伤风杆菌* | ATCC 19406 |
| *柯氏杆菌* | ATCC 25986 |
| *生殖棒状杆菌* | LSPQ 3583 |
| *脱硫弧菌* | ATCC 29098 |
| *爱德华氏菌* | ATCC 15947 |
| *粘液真杆菌* | CCRI-9926 /IDI 1990 |
| *产气肠杆菌* | ATCC 13048 |
| *阴沟肠杆菌* | ATCC 13047 |
| *肠球菌（vanC2）* | CCRI-1 566 / IDI 1981 |
| *盲肠肠球菌*  | ATCC 43198 |
| *殊异肠球菌*  | ATCC 51266 |
| *粪肠球菌vanB* | ATCC 51299 |
| *屎肠球菌vanA* | ATCC 700221 |
| *肠球菌/线粒甘草* | CCRI-1561 /IDI 1982 |
| *肠球菌* | ATCC 8043 |
| *肠球菌* | ATCC 49427 |
| *大肠杆菌* | ATCC 23511 |
| *大肠杆菌* | ToplO （IDI-266） |
| *埃希氏菌* | ATCC 35469 |
| *大肠杆菌* | ATCC 33650 |
| *杆菌杆菌* | ATCC 8501 |
| *阴道加德纳菌属* | ATCC 14019 |
| *麻疹孪生球菌*  | ATCC 27824 |
| *蜂窝哈夫尼亚菌* | ATCC 13337 |
| *芬太尼杆菌* | ATCC 35683 / IDI-2180 |
| *幽门螺杆菌* | ATCC 43504 |
| *智人* | ATCC MGC-1 5492 / 2.16 |
| *克雷伯杆菌* | ATCC 33496 |
| *克雷伯氏菌* | ATCC 33497 |
| *肺炎克雷伯氏菌亚种 肺炎支原体* | ATCC 13883 |
| *嗜酸乳杆菌* | ATCC 4356 |
| *罗伊氏乳杆菌* | ATCC 23272 |
| *乳酸乳球菌* | ATCC 11454 |
| *枸杞子* | ATCC 33999 |
| *格氏李斯特菌* | ATCC 19120 |
| *无害利斯特菌* | ATCC 33090 |
| *单核细胞增多性李斯特菌* | L374 |

|  |  |
| --- | --- |
| 属与种类 | 菌株 |
| *不解糖 嗜胨菌* | ATCC 14963 |
| *消化不良链球菌* | ATCC 27337 |
| *类志贺邻单胞菌* | ATCC 14029 |
| *溶血卟啉单胞菌* | ATCC 25260 |
| *产黑色普雷沃菌* | ATCC 25845 |
| *奇异变形杆菌* | ATCC 25933 |
| *变形杆菌* | ATCC 35198 |
| *产碱普罗威登斯菌* | ATCC 9886 |
| *雷氏普罗威登斯菌* | ATCC 9250 |
| *斯氏普罗威登斯菌* | ATCC 33672 |
| *铜绿假单胞菌* | ATCC 35554 |
| *恶臭假单胞菌* | LCDC D7172 |
| *溴红菌* | ATCC 27255 |
| *伤寒沙门氏菌* | ATCC 14028 |
| *猪霍乱沙门菌亚利桑那亚种（以前称为Choleraesuis arizonae）* | ATCC 13314 |
| *猪霍乱沙门菌肠道亚种（以前称为* | ATCC 7001 |
| *猪霍乱沙门氏菌猪霍乱亚种）* | ATCC 14028 |
| *液化沙雷氏菌* | ATCC 27592 |
| *粘质沙雷氏菌2* | ATCC 13880 |
| *志贺氏志贺氏菌* | ATCC 9207 |
| *志贺氏痢疾志贺氏菌* | ATCC 11835 |
| *志贺氏菌* | ATCC 29930 |
| *金黄色葡萄球菌3* | ATCC 43300 |
| *表皮葡萄球菌* | ATCC 14990 |
| *嗜麦芽寡养单胞菌* | ATCC 13637 |
| *无乳链球菌* | ATCC 12973 |
| *无乳链球菌* | ATCC 43078 |
| *中链球菌* | ATCC 27335 |
| *乳房链球菌* | ATCC 19436 |
| *关岛特拉布斯氏菌* | ATCC 49490 |
| *维他龙属* | ATCC 10790 |
| *霍乱弧菌* | ATCC 25870 |
| *副溶血性弧菌* | ATCC 17802 |
| *耶尔森氏菌* | ATCC 43970 |
| *耶尔森氏菌* | ATCC 43380 |
| *腺病毒* |  |
| *轮状病毒* |  |
| *诺如病毒* |  |
| *肠道病毒* |  |
| *回声病毒* |  |
| *柯萨奇病毒* |  |
| *巨细胞病毒* |  |

*微生物干扰*

我们建议贵公司使用潜在干扰微生物的临床相关浓度（细菌通常为10 6 cfu / ml或更高，而病毒通常为105 pfu / ml或更高）针对未被检测的微生物干扰对贵公司的测定进行评价。潜在干扰微生物应与推荐用于交叉反应研究中的试验的微生物相同。我们建议贵公司在本研究中使用多种艰难梭菌菌株，其水平接近每种菌株的LoD。

*干扰*

我们建议贵公司使用干扰物的医学相关浓度以及多种产毒性艰难梭菌菌株进行全面干扰研究，以评估血液和粪便样本中存在的物质的潜在抑制作用。潜在干扰物质包括但不限于偶尔使用或发现于肛周、直肠和/或粪便样本、血液和粘液中的生物和化学物质。

潜在干扰物质的示例在表4中给出。我们建议贵公司以每种艰难梭菌菌株和每种干扰物质的测定临界值时对干扰进行测试。我们还建议贵公司以其潜在最高浓度（“最坏情况”）评价每种干扰物质。如果未观察到显著的临床效果，则无需进行进一步的试验。有关其他信息，请参考CLSI文件EP7-A2 [参考文件：6]。

**表3.建议用于干扰研究的物质**

|  |  |
| --- | --- |
| **物质** | **有效成分** |
| 抗真菌/抗痒阴道 | 制霉菌素 |
| 霜/软膏/栓剂 | 氢化可的松 |
| 抗痔疮霜/软膏 | 去氧肾上腺素 |
| 抗酸剂 | 碳酸钙/氢氧化铝/氢氧化镁 |
| 灌肠剂 | 美沙拉嗪/矿物油 |
| 避孕套与杀精润滑剂 | 壬苯醇醚-9 |
| 抗腹泻药物 | 盐酸洛哌丁胺/次水铋铋 |
| 泻药 | 番泻苷 |
| 抗生素（口服和局部） | 抗生素 |
| 非甾体抗炎药物 | 萘普生钠 |
| 潮湿毛巾 | 苯扎氯铵，乙醇 |
| 粪便脂肪 | 脂质等 |
| 血液 | 葡萄糖，激素，酶，离子，铁等 |
| 粘液 | 免疫球蛋白，溶菌酶，聚合物等 |

精确性

*实验室内精确性/复现性*

我们建议贵公司对含有工具或自动化组件的器械进行实验室内精确性研究。贵公司可以在内部执行这些研究，即在贵公司自己的公司内。

我们建议贵公司测试变异性来源（如操作者，天数，测定运行等），至少须进行12天（不一定连续），其中，每天运行两次，每次运行对每个样本重复测试两次。这些试验天数应至少跨越两个校准周期。试验组应包括掺入相关样本基质或模拟样本基质的3-6个样本（1-2株）（前提是贵公司可以证明器械可使用实际样本基质和模拟样本基质产生相同结果），其具有三种浓度，包括：

* + - “高阴性”样本（C5浓度）：分析物浓度低于临界临界值的样本，使得对该样本进行的重复试验的结果约95％为阴性（约5％的结果为阳性）
		- “低阳性”样本（C95浓度）：分析物浓度刚好高于临界临界值的样本，使得对该样本进行的重复试验的结果约95％为阳性
		- “中等阳性”样本：浓度可使约100％的试验结果预期为阳性的样本（例如，临床临界浓度的2至3倍左右）。

当将空白极限（LoB）用作临界值时，则浓度C95与检测限（LoD）相同，且零浓度（样本中不存在分析物）为C5 [ 参考文件：5]。CLSI文件EP5-A2 [参考文件：7]和EP12-A2 [ 参考文件：8]包含有关设计和执行精确性研究的进一步信息。

*复现性*

复现性研究的方案可能因测定形式而稍有不同。作为一般指南，我们建议使用以下方案：

* + - 在三个试验中心（例如，两个外部中心和一个内部中心）评价贵公司试验的复现性。

2对于超敏感试验，例如实时PCR测定，可能无法获得C5样本。对于这种器械，C5样本可以用以下两种样本代替：

* + - 阴性样本：未含有分析物的样本，使得对该样本进行的重复试验的结果100％为阴性。
		- “高阴性/低阳性”样本（C20至C80浓度）：浓度低于临床临界值的样本，使得对该样本进行的重复试验的结果约20％至80％为阴性。
		- 使用长达五天的试验方案，其中包括，每天至少运行两次（除非测定设计排除了每天多次运行），每次运行时对每个小组成员重复试验三次。
		- 每天，至少使两名操作者在各中心进行该试验。为足以代表将使用器械的环境，贵公司应在贵公司的评价中纳入更多器械以用于快速试验或护理点（POC）器械。
		- 使用与上述复现性研究中所述相同的样本组。

CLSI文件，EP15-A2 [参考文件：9]含有有关复现性研究设计的其他信息。

样本存储和运输条件

如果贵公司已针对样本存储条件提出意见，贵公司应该证明贵公司的器械对于在推荐存储期间的几个时间点和推荐温度范围的两端存储的样本可产生相同结果。如果推荐使用特殊的选择性/运输介质（即Cary Blair）进行存储或运输，则应进行适当的研究，以证明该器械在样本保存在此类介质中时的性能与所述相同。[参考文件：10]

## 临床性能研究

我们建议贵公司进行预期临床研究，以针对贵公司在标签中声明的所有样本类型确定贵公司器械的性能。我们建议贵公司将器械与已确定方法或“黄金标准”进行比较，具体取决于艰难梭菌测定所需检测的分析物。用于检测毒素的组织培养测定被视为研究新艰难梭菌相关腹泻（CDAD）诊断技术的研究的黄金标准。

与评价性能特性的研究一样，对于任何新技术，在开始比较研究之前，贵公司可以联系微生物学器械部获得有关贵公司的研究计划的输入。

*研究方案*

我们强烈建议贵公司制定详细的研究方案，其须包括患者入选和排除标准、所需样本的类型和数量、使用说明以及解释差异以防止数据产生偏差的统计分析计划。贵公司应该在上市前申报文件中提供此和任何其他相关方案信息。我们鼓励发起人联系微生物器械部以要求对其拟定研究和样本类型的选择进行审查。其被称为预IDE过程[参考文件：11]。

*样本类型*

我们建议贵公司纳入足够数量的预期采集的样本，以产生敏感性结果，其中，其双侧95％置信区间（CI）的下限大于90％。通常，我们建议至少测试100个样本，经参考方法确定为阳性。贵公司应该使用新鲜的预期采集的样本。如果仅有有限数量的样本可用，则可以使用新鲜和冷冻样本； 但是，贵公司应该单独分析数据。可接受的样本包括提交给试验实验室以排除可疑CDAD的患者粪便样本。此类样本由来自具有或不具有抗生素使用历史的患者的腹泻粪便组成。

我们建议贵公司联系微生物学部以讨论这些替代方案。

*研究中心*

我们建议贵公司至少在处于不同地理位置的三个不同中心进行研究，其中一个可能是内部研究。未批准和未许可的体外诊断器械（包括用于检测艰难梭菌的诊断器械）的临床研究受制于联邦食品、药品和化妆品法案（21 USC 360j）第520（g）节的器械豁免临床研究（IDE） 以及已实施法规。贵公司应考虑21 CFR第812部分（IDEs）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（机构审查委员会评审）以获得其他适用要求。

我们建议对用于护理点（POC）用途或快速试验的器械进行的性能评估至少包括一个位于临床实验室的中心以及代表该器械适用的非实验室环境的中心（例如，医生办公室、急诊科）。由（1）更有经验和训练有素的人员在临床实验室中以及由受到的实验室训练可能较少的操作者在（2）该器械适用的非实验室中心中使用该器械进行试验将有助于确定对进行试验的人员进行训练是否会影响该器械的性能。

*研究人群*

我们建议贵公司对具有艰难梭菌感染症状的个体进行研究（例如，显著的腹泻（“每24小时内部分形成> 3次新发作或水样便”）、使用抗生素、腹痛、粪便 气味等）。

如果贵公司的器械用于筛查个体是否出现艰难梭菌感染，贵公司还应该在研究人群中纳入无症状的个体。我们建议贵公司纳入取自每个年龄组且其数量有意义的样本。除提供总体数据摘要表外，我们建议贵公司按照年龄（例如，小于5、6-21、22-59和大于60岁）分层显示数据。

## 携带和交叉污染研究（用于需要工具的多样本测定和器械）

贵公司应该证明贵公司的器械不会发生携带和交叉污染。在携带和交叉污染研究中，我们建议串联使用高阳性样本与高阴性样本，这取决于器件的操作功能。贵公司应该至少进行五次萃取运行，并交替使用高阳性和高阴性（C5）样本。我们建议研究中的高阳性样本应具有足够数量，以超过从预期使用人群中患病患者样本获得的结果的95％或以上。高阴性样本应含有低于临界值的分析物浓度，使得对此类样本进行的重复试验的结果约95％为阴性。（对于超敏感试验，例如实时PCR测定，可能无法获得高阴性（C5）样本，并且对于这种器械，高阴性样本可以用阴性样本代替）。然后可以通过携带研究中高负样本的阴性结果百分比（与95％相比较）来估计携带和交叉污染效应 [参考文件 ：12] 。

1. **基于核酸的艰难梭菌器械**

用于检测致病性艰难梭菌的核酸试验（NAT）通常以致病性基因座（PaLoc）的特定区域为靶标，并且应该与细胞毒性测定紧密相关。应当仔细设计用于所选靶区域的引物和探头，因为如果靶标出现突变和/或缺失，则可导致NAT的敏感性降低，但对细胞毒性具有较小或无影响。此类突变和/或缺失可导致NAT的假阴性结果增加。如果靶区域与细胞毒性不具密切相关性，则NAT的敏感性可能不受可消除细胞毒性的PaLoc变化的影响，从而生成NAT的假阳性结果。我们建议贵公司整理或编制生物信息数据，以支持靶标的选择及其与细胞毒性的相关性。携带和交叉污染研究在确定基于核酸的艰难梭菌测定的性能中特别重要。本节补充本文件前面所述的性能研究建议[参考文件：13]。

**用于基于核酸的艰难梭菌测定的控制**

我们建议贵公司在分析和临床研究中使用质量控制材料来验证测定性能。此外，贵公司应该确定每种控制类型的可接受范围，并说明贵公司如何为这些控制确定接受标准。

我们建议贵公司在为器械设计特定控制时向食品药品监督管理局咨询。我们一般建议贵公司纳入以下四种类型的控制。根据控制和测定工作流程的具体组成，可以组合一些控制：

* + 阴性控制，其用于排除污染
	+ 阳性控制，其用于验证PCR试剂和工具是否正常运行
	+ 内部控制，其用于验证样本的阴性结果并非由PCR抑制剂引起
	+ 萃取控制，其用于验证裂解和核酸分离过程是否正常运行

*阴性控制*

*空白或无模板控制*

空白或无模板控制应含有缓冲液或样本运送培养基和除靶核酸外的所有测定组分。这些控制用于排除靶核酸的污染或扩增反应中的背景突出。但其可能不适用于在单次试验一次性灌流器或导管中进行的测定。

*阴性样本控制*

阴性样本控制含有非靶核酸，或者如果用于评价萃取程序，其包含整个微生物。其示出了非特异性引发或检测，并指出在不存在靶序列的情况下无法获得信号。可接受的阴性样本控制材料的示例包括：

* 来自未感染患者的样本
* 含有非目标微生物的样本（例如，非产毒性艰难梭菌）
* 替代阴性控制（例如，外源壳体化DNA）

阳性控制

*用于完全测定的阳性控制*

阳性控制含有靶核酸并且用于控制整个测定过程，包括DNA萃取、扩增和检测。其设计用于模拟患者样本，并作为单独试验，与患者样本同时，以由实验室质量体系（QS）确定的频率运行。可接受的阳性测定控制材料的示例包括：

* 含有目标区域的产毒性艰难梭菌菌株
* 来自含有靶区域的产毒性艰难梭菌菌株的包裹DNA

*用于扩增/检测的阳性控制*

* 用于扩增/检测的阳性控制含有位于或接近用于定性测定的检测限的纯化靶核酸，并且未接受萃取过程。当获得阴性结果时，其控制PCR试剂和工具的完整性。其表明，如果靶标存在于萃取样本中，则该靶标可被检测到。这种控制类型的一个示例是含有一部分靶基因的非感染性DNA质粒。

*内部控制*

内部控制是与靶核酸共萃取和共扩增的非靶核酸序列。其控制试剂（聚合酶，引物等）的完整性、器械功能（热循环仪）和样本中抑制剂的存在。可接受的内部控制材料的示例包括与艰难梭菌共萃取的人类核酸和扩增人类辅助基因（例如RNaseP，β-肌动蛋白）的引物或在萃取之前加入样本的核酸。优选情况下，在内部控制中扩增的靶区域的长度至少等于艰难梭菌靶标在的靶区域长度。是否需要进行这种控制应根据具体情况确定[参考文件：10]。

*萃取反应控制*

萃取反应控制可验证艰难梭菌的裂解和后续核酸分离是否有效发生。萃取反应控制的示例包括以与艰难梭菌类似方式裂解的微生物、含有靶区域的艰难梭菌菌株或已知的阳性临床样本。基于其具体成分，阳性控制或内部控制也可用作萃取反应控制。

## CLIA 豁免

如果贵公司希望根据1988年临床实验室改进法案（CLIA）为贵公司的器械申请CLIA豁免，我们建议贵公司咨询微生物学器械司的工作人员，了解具体研究的设计，以支持贵公司的器械的CLIA豁免申请 。行业和食品药品监督管理局工作人员指南，“对于体外诊断器械制造商申请1988年临床实验室改进法案（CLIA）豁免的建议”，见http://www.fda.gov/downloads/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/ GuidanceDo cuments / ucm070890.pdf。

# 参考文件

* 1. Ryan KJ； Ray CG （editors） （2004）. *Sherris Medical Microbiology*， 4th ed.， McGraw Hill， pp. 322-4. ISBN 0-8385-8529-9
	2. "Pseudomembranous Colitis". *eMedicine*. WebMD （2005-07-01）. Retrieved on 2007- 01-11.
	3. Hall I， O'Toole E （1935）. "Intestinal flora in newborn infants with a description of a new pathogenic anaerobe， *Bacillus difficilis*". *Am J Dis Child* **49**：390.
	4. "Cleaning agents 'make bug strong'"， *BBC News Online* （2006-04-03）
	5. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Protocol for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation； Approved Guideline （EP17-A）
	6. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. Interference Testing in Clinical Chemistry； Approved Guideline—Second Edition （EP7-A2）
	7. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2004. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods； Approved Guideline—Second Edition （EP5-A2）
	8. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008. User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance； Approved Guideline— Second Edition （EP12-A2）
	9. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2005. User Verification of Performance for Precision and Trueness； Approved Guideline—Second Edition （EP15-A2）
	10. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2003. Quality Control for Microbiological Transport Systems； Approved Standard

（M40-A）

* 1. Center for Devices and Radiological Health， Office of Device Evaluation. January 20， 1998. Guidance on IDE Policies and Procedures
	2. Haeckel R. Proposals for the description and measurement of carry-over effects in clinical chemistry. *Pure Appl. Chem*. 1991； 63：302-306.
	3. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2006 Molecular Diagnostic Methods for Infectious Disease； Proposed Guideline. MM3-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute， Wayne PA.