

# 结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂 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结核分枝杆菌复合群耐药基因突变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对注册申报资料的技术审评提供参考。

本指导原则是针对结核分枝杆菌复合群耐药基因突变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，需阐述具体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。

本指导原则是对注册申请人和审查人员的指导性文件，但不包括注册审批所涉及的行政事项，也不作为法规强制执行，如果有能够满足相关法规要求的其他方法，也可以采用，但需要详细阐明理由，并对其科学合理性进行验证，提供详细的研究资料和验证资料，相关人员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和标准体系以及当前认知水平下制定的，随着法规和标准的不断完善，以及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

本指导原则所述结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂是指：利用分子生物学技术，对结核病患者的临床样本或培养物样本中的结核分枝杆菌复合群耐药基因突变进行体外定性检测的试剂。针对该定义，需要强调如下几点。

1.适用人群为：结核病患者。特别注意的是，对于同一注册单元内可同时进行结核分枝杆菌复合群核酸检测以及耐药基因突变检测的双功能试剂，尽管其核酸检测部分的适用人群为疑似结核病患者，但只有核酸阳性才能进行下一步的耐药基因突变检测，因此其耐药基因突变检测部分的适用人群为结核病患者。

2.适用样本可为：

2.1 痰、支气管肺泡灌洗液或其他体液等临床样本或培养物样本；

2.2 进行结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测的上述样本应为结核分枝杆菌复合群阳性的样本。即：来自结核患者的、结核分枝杆菌复合群阳性的痰、支气管肺泡灌洗液或其他体液等临床样本或培养物样本。

3.结核分枝杆菌复合群阳性的确认方法可为：已获国家食品药品监督管理局批准上市的结核分枝杆菌复合群检测试剂或临床普遍认可的结核分枝杆菌复合群鉴定方法（如：结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂或传统的结核分枝杆菌复合群培养鉴定方法）。

4.对于同一注册单元内可同时进行结核分枝杆菌复合群核酸检测以及耐药基因突变检测的双功能试剂，其耐药基因突变检测部分适用于本指导原则。

本指导原则所述产品的预期用途可表述为以下三种类型：

1.申报产品可区分具体突变类型，结果报告具体突变类型（a类）。建议表述为：本产品用于体外定性检测来自结核患者的

结核分枝杆菌复合群阳性的 xx 样本中的 yy 耐药基因突变，可检测的突变类型包括 zz，本产品可区分具体突变类型。

2.已知申报产品可检测的具体突变类型（如：针对具体突变类型设计特异突变探针，从检验原理上已知可检测哪些突变类型），但结果不区分具体突变类型，结果报告为耐药/敏感等（b类）。建议表述为：本产品用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的 xx 样本中的 yy 耐药基因突变，可检测的突变类型包括 zz，本产品不区分具体突变类型。

3.某段核酸区域的突变可导致对某种药物耐药，申报产品从检验原理上没有必要明确具体突变类型，结果报告为耐药/敏感（c类）。建议表述为：本产品用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的 xx 样本中的 yy 耐药，本产品无法明确具体突变类型。

本指导原则的技术要求是基于荧光探针 PCR 方法确立的，对于线性杂交或基因芯片等其他核酸检测技术，可能部分要求不完全适用或本指导原则所述技术指标不够全面，注册申请人可根据产品特性选择合适的方法进行评价和验证，但需阐述不适用的理由，并验证其科学性，同时确认性能评价的充分性。本指导原则适用于进行首次注册申报和相关许可事项变更的产品。

## 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、研究结果的总结评价以及同类产品上市情况介绍等内容，其中同类产品上市情况介绍部分应着重从检测靶标、方法学及不同基因突变类型检出能力等方面写明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。若尚无同类产品批准上市，则应提交详实充分的科学证据，包括：突变区域、突变类型与结核分枝杆菌复合群表型耐药的相关性以及突变检测的临床意义，证明申报产品的检测靶标具有明确的临床意义。

综述资料应符合《体外诊断试剂注册管理办法》（国家食品药品监督管理局令第5号，以下简称《办法》）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局公告2014年第44号）的相关要求。

## （二）主要原材料的研究资料

应提供主要原材料如引物、探针、企业参考品的选择与来源、制备过程、质量分析和质控标准等相关研究资料。若主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定，并提交工艺验证报告；如主要原材料购自其他供货商，应提供的资料包括：供货方提供的质量标准、出厂检定报告，以及该原材料到货后的质量检验资料。

1.核酸分离纯化组分（如有）的主要组成、原理介绍及相关的验证资料。

2.PCR组分的主要原料（包括引物、探针、各种酶及其他主要原料）的选择、制备、质量标准及实验研究资料，主要包括以下内容：

## 2.1 脱氧三磷酸核苷 (dNTP)

核酸的组成成分,包括:dATP、dUTP、dGTP、dCTP 和 dTTP;应提交对纯度、浓度以及保存稳定性等的验证资料。

## 2.2 引物

由一定数量的 dNTP 构成的特定序列,通常采用 DNA 合成仪人工合成,合成后经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 或其他适宜方法纯化。需提供对分子量、纯度、稳定性以及功能性实验等的验证资料。如为外购,还应提供合成机构出具的合成产物的质检证明,如 PAGE 结果或高效液相色谱法 (HPLC) 分析图谱。

## 2.3 探针

特定的带有示踪物 (标记物) 的已知核酸片段 (寡聚核苷酸片段),能与互补核酸序列退火杂交,用于特定核酸序列的探测。合成后经聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 或其他适宜方法纯化,在 5-端 (和/或 3-端) 进行标记,并经 HPLC 或其他适宜方法纯化,纯度应达到 HPLC 纯。应提供合成机构出具的合成产物的质检证明,如 HPLC 分析图谱,应对探针的分子量、纯度及标记的荧光素进行核实,并进行功能性试验验证。

## 2.4 酶

DNA 聚合酶,应具有 DNA 聚合酶活性,无核酸内切酶活性,具热稳定性,如:94℃保温 1 小时后仍保持 50%活性;尿嘧啶 DNA 糖基化酶 (UDG/UNG),具有水解尿嘧啶糖苷键的活性,无核酸外切酶及核酸内切酶活性。应对酶活性进行合理验证。

3.核酸类检测试剂的包装材料和耗材应无脱氧核糖核酸酶

(DNase) 污染。

4.企业参考品：详细说明企业参考品的原料选择、制备和定值过程等试验资料。

#### 4.1 阳性参考品

应包括申报产品声称的全部突变类型。阳性参考品的突变类型需经过金标准方法或已上市同类分型试剂的确认。常见突变类型的阳性参考品至少有 1—2 种突变类型采用菌株，其他突变类型的阳性参考品可以采用含有突变的核酸（如：结核分枝杆菌基因组 DNA 或质粒），不建议采用临床样本（如痰液）作为阳性参考品。注册申请人可根据权威机构的最新文件或文献等确定常见突变类型，并提交相应的支持资料。

#### 4.2 阴性参考品

可采用经确认靶序列未发生突变的结核分枝杆菌菌株、申报产品声称的其他无关突变类型的核酸等。

#### 4.3 最低检测限参考品

最低检测限参考品须含有声称的所有突变类型。常见突变类型的最低检测限参考品至少有 1—2 种突变类型采用菌株，其他突变类型可采用含有突变的核酸。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。

#### 4.4 精密度参考品

精密度参考品至少应包括弱阳性（低浓度突变型）水平，须含有申报产品声称的所有突变类型。常见突变类型的精密度参考品至少有 1—2 种突变类型采用菌株，其他突变类型可采用含有突变的核酸。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1

阳性参考品”。

对于 c 类预期用途的产品，申请人应尽可能对国内已报告的耐药核酸区域内的常见突变类型设置上述各种类型的企业参考品。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。对于利福平耐药基因突变检测试剂，阳性参考品、最低检测限参考品以及精密度参考品至少应包括 4—5 种常见突变类型，并且至少有 1—2 种突变类型采用菌株。对于其他药物的耐药基因突变检测试剂，阳性参考品、最低检测限参考品以及精密度参考品至少应包括耐药相关的常见突变类型，并且至少应有 1—2 种突变类型采用菌株，突变类型的数量可根据申报产品的具体情况而定。

## 5. 试剂盒内的对照

申报产品的质控体系通过设置各种对照来实现，以对样本核酸分离纯化、配液及加样、试剂及仪器性能、扩增反应抑制物（管内抑制）、交叉污染和靶核酸降解等因素可能造成的假阴性或假阳性结果进行合理质控。申报资料应详细说明各种对照的原料选择、制备和定值过程等。

本指导原则的技术要求是基于荧光探针 PCR 方法建立的，对于采用该方法学的结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测试剂，建议至少设置阳性对照、内对照和阴性对照。

### 5.1 阳性对照

阳性对照可对实验过程进行质控。阳性对照可采用菌株、质粒或基因组提取物等。企业应对阳性对照相应判断数值做出明确

要求。

## 5.2 内对照

内对照可对实验过程的假阴性结果进行质量控制。内对照可采用质粒或线性 DNA 等。申请人应对内对照的引物、探针和模板浓度做精确的验证,既要保证内标荧光通道呈明显的阳性又要尽量降低对靶核酸序列检测造成的抑制而导致假阴性。企业应对内对照或相应判断数值做出明确要求。

## 5.3 阴性对照

阴性对照可采用含有野生型靶序列的核酸或空白对照,以对交叉污染造成的假阳性结果进行质控。阴性对照需参与样本核酸的平行提取纯化。

由于申报产品所适用的临床样本比较复杂,其中可能含有各种影响 PCR 反应的抑制物,造成假阴性。因此,申报产品应充分考虑对样本核酸提取纯化环节的质量控制,通过设置各种对照进行质控。比如,采用克隆菌株作为内对照或阳性对照并参与样本核酸的平行提取纯化,或者设置专门的核酸提取纯化对照(如菌株)等,以对样本核酸提取纯化的质量及效率进行评估。

### (三) 主要生产工艺及反应体系的研究资料

生产工艺及反应体系的研究资料应能对反应体系涉及到的基本内容,如临床样本用量、试剂用量、反应条件和质控体系设置等,提供确切的依据,配制工作液的各种原材料及其配比应符合要求,原材料应混合均匀,配制过程应对 pH、电导率、离子浓度等关键参数进行有效控制。主要包括以下内容:

- 1.主要生产工艺介绍，可以图表方式表示。
- 2.确定最佳 PCR 反应体系的研究资料，包括酶浓度、引物/探针浓度、dNTP 浓度以及阳离子浓度等。
- 3.PCR 反应各阶段温度、时间及循环数的研究资料。
- 4.对于基线阈值和阈值循环数等确定的研究资料。
- 5.如申报产品包含核酸提取纯化试剂，应提交对核酸提取纯化过程进行工艺优化的研究资料。

#### （四）分析性能评估资料

申请人应提交对申报产品进行的所有性能验证的研究资料，包括具体试验方法、内控标准、实验数据和统计分析等详细资料。该产品建议着重对以下分析性能进行研究。

##### 1.阳性/阴性参考品符合率

各突变类型的阳性参考品均应检出阳性/耐药，阴性参考品应检测为阴性/敏感。其中，常见突变类型至少有 1—2 种突变类型采用耐药菌株，其他突变类型可采用含有突变的核酸样本。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。

##### 2.最低检测限

建议采用 95% ( $n \geq 20$ ) 的阳性检出率作为最低检测限确定的标准。扩增反应终体系中的突变序列百分率和总核酸浓度两个因素对最低检测限的影响较大，终体系中突变序列的百分率越高、所含的 DNA 量越多，则越容易检出。而终体系中的这两个因素是由临床样本中的结核分枝杆菌耐药菌与野生菌的含量和相对比例决定的。因此，需从以下两个方面考察申报产品的最低检测

限。

## 2.1 100%耐药比例下，耐药菌株/突变核酸的最低检测浓度

将结核分枝杆菌耐药菌株/突变核酸进行系列稀释，制备不同浓度的耐药菌株/突变核酸样本。其中，常见突变类型至少有1—2种突变类型采用耐药菌株，其他突变类型可采用含有相应突变的核酸样本（如：质粒或基因组 DNA）。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。

分别对各浓度样本进行不少于 20 次的重复检测，确定 95% 阳性检出率水平，作为可检测的最低耐药菌株/突变核酸浓度。

## 2.2 不同菌株/核酸浓度、各种耐药比例的最低检测限。

配制不同菌株/核酸浓度、各种耐药比例的混合液：将不同浓度的结核分枝杆菌野生菌株和耐药菌株进行混合，调整野生和耐药菌株的比例，得到含不同菌株浓度和各种耐药比例的菌株混合液。或者，将不同浓度的野生质粒和突变质粒进行混合，调整野生质粒和突变质粒的比例，得到含不同核酸浓度和各种耐药比例的核酸混合液。其中，常见突变类型至少有 1—2 种突变类型采用耐药菌株，其他突变类型可采用含有突变的核酸样本（如：质粒或基因组 DNA）。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。

对各份混合液进行不少于 20 次的重复检测，确定 95% 阳性检出率水平，作为不同菌株/核酸浓度、各种耐药比例的最低检测限。

为确定痰样本的最低检测限，建议将至少 1 株结核分枝杆菌

耐药/敏感菌株、结核分枝杆菌阴性的痰样本进行混合，完全按照申报产品的操作步骤对此“制备痰液”进行样本前处理、核酸提取纯化和扩增等。对结核分枝杆菌阴性痰样本的确认，应采用涂片、培养鉴定、临床诊断和其他已上市的核酸检测试剂盒进行联合确认。

应明确每种菌株/核酸的来源、突变类型、浓度和制备方法等信息。

企业可采用适宜方法进行菌株浓度的确认，可采用铺板计数细菌集落形成单位（colony forming unit, CFU）的方法进行菌株浓度的确认，以 CFU/mL 作为菌株浓度的表示方式；也可采用国家参考品对菌株浓度进行标定，以“个菌/mL”作为菌株浓度的表示方式。

### 3.分析特异性

3.1 野生型验证：采用不同浓度的野生型结核分枝杆菌进行验证，结果应为敏感或阴性。

3.2 申报产品声称的全部突变类型间的交叉反应验证。

3.3 对于痰等复杂的临床样本类型，鉴于可检测样本中可能同时含有结核分枝杆菌复合群和非结核分枝杆菌复合群，为了验证非结核分枝杆菌复合群等其他病原体对申报产品的检测结果是否造成假阴性和假阳性结果，需对核酸序列具有同源性、易引起相同或相似的临床症状、采样部位正常寄生或易并发的其他病原体进行交叉反应的验证。

用于交叉反应研究的其他分枝杆菌具体包括：堪萨斯分枝杆

菌、海分枝杆菌、土地分枝杆菌、次要分枝杆菌、溃疡分枝杆菌、戈登分枝杆菌、蟾蜍分枝杆菌、鸟分枝杆菌、瘰疬分枝杆菌、苏加分枝杆菌、龟分枝杆菌、脓肿分枝杆菌、耻垢分枝杆菌、偶然分枝杆菌、胃分枝杆菌、胞内分枝杆菌、草分枝杆菌。上述细菌均应进行验证。

用于交叉反应研究的其他病原体具体包括：肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、大肠杆菌、表皮葡萄球菌、隐球菌、金黄色葡萄球菌、诺卡氏菌、绿脓杆菌、白色念珠菌。上述病原体均应进行验证。

对于培养物样本类型，3.3 项不适用。

#### 4. 干扰物质

4.1 潜在干扰物质主要包括：内源性物质（不含待检野生/突变靶标的相应临床样本）和外源性药物。建议使用医学相关水平的干扰物浓度进行验证。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。对于常见药物干扰试验，建议参照相应药物药代动力学研究确定的治疗药物浓度添加相应药物进行干扰验证。具体目录参见表 3。

用于干扰研究的外源性药物具体包括：异烟肼、利福平、抗生素（如：阿莫西林、左氧氟沙星）、鼻腔喷雾剂或滴鼻剂（如：肾上腺素、羟甲唑啉、含防腐剂的氯化钠溶液）、鼻用软膏类（如：莫匹罗星）、乙胺丁醇、吡嗪酰胺、抗病毒药（如：扎那米韦）、鼻腔糖皮质激素（如：倍氯米松、地塞米松、氟尼缩松、曲安西龙、布地奈德、莫美他松、氟替卡松）。上述外源性药物均应进

行验证，括号内至少选做一种。

对于培养物样本类型，4.1 项不适用。

4.2 对于培养物样本，干扰物质主要为适用培养基和相关药物的干扰，应在最低检测限浓度/阴性条件下验证相关药物和培养基对检测结果的影响，明确不产生干扰的最大培养基和药物浓度。

## 5. 精密度

测量精密度的评价方法并无统一的标准可依，可根据不同产品特征或企业的研究习惯进行，前提是必须保证研究的科学性。具体实验方法可以参考国内或国外的相关文件进行。企业应对每项精密度指标的评价标准做出合理要求。针对申报产品的精密度评价主要包括以下要求。

5.1 对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除申报产品（包括提取纯化组分和 PCR 组分）本身的影响外，还应对不同的适用机型（如 PCR 分析仪）、操作者和地点等要素进行相关的验证。

5.2 合理的精密度评价周期，例如：为期至少 12 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。如有条件，申请人应选择不同的实验室进行重复实验以对室间精密度进行评价。

5.3 建议在以下 3 个浓度进行验证：

5.3.1 阴性样本：靶序列未发生突变的结核分枝杆菌野生型

菌株，阴性检出率应为 100% ( $n \geq 20$ )。

5.3.2 弱阳性样本：耐药菌株/突变核酸浓度略高于申报产品的最低检测限，阳性检出率应高于 95% ( $n \geq 20$ )。（弱阳性样本应包括申报产品声称的所有突变类型。常见突变类型至少有 1—2 种突变类型采用耐药菌株，其他突变类型可采用含有突变的核酸样本。）

5.3.3 中等阳性样本：耐药菌株/突变核酸浓度约为最低检测限的 2 倍或 3 倍，阳性检出率为 100%且  $CV \leq 15\%$  ( $n \geq 20$ )。

（可选择申报产品声称的部分突变类型进行验证，但至少应包括 1 株结核分枝杆菌耐药菌株。）

6. 不同样本前处理方法和核酸提取纯化方法的分析性能资料要求

如果某种样本类型可采用几种方法进行样本前处理（如：痰/痰沉淀物），申请人应提交适用的样本前处理方法（进行全项目分析性能评估的样本前处理方法除外）与后续试验配合进行的性能试验（至少包括最低检测限项目），以证明不同的样本前处理方法不影响检测结果。

如果某种样本类型可采用几种方法进行核酸提取纯化，申请人应提供适用的核酸提取纯化方法（进行全项目分析性能评估的核酸提取纯化方法除外）与后续试验配合进行的性能试验（至少包括最低检测限和精密度项目），以证明不同的核酸提取纯化方法不影响检测结果。

对于 c 类预期用途的产品，申请人应对国内已报告的耐药核

酸区域内的常见突变类型进行上述分析性能项目的验证。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。对于利福平耐药基因突变检测试剂，阳性符合率、最低检测限以及精密度试验至少应包括 4—5 种常见突变类型，并且至少有 1—2 种突变类型采用菌株。对于其他药物的耐药基因突变检测试剂，阳性符合率、最低检测限以及精密度试验至少应包括耐药相关的常见突变类型，并且至少应有 1—2 种突变类型采用菌株，突变类型的数量可根据申报产品的具体情况而定。

对于适用多个机型的产品，应提供如产品说明书【适用仪器】项中所列的所有型号仪器的至少三批全性能评估资料。

#### （五）阳性判断值确定资料

对于此类试剂，阳性判断值确定资料主要是指 Ct 值/Ct 值的差值/荧光信号差值等的确认资料，建议申请人采用受试者工作特征（ROC）曲线的方式对申报产品用于结果判断的临界值予以确认。有关 ROC 曲线分析的细节，请参考国内外相关的文件。如存在灰区，应提交灰区上下限确定的详细研究资料。

#### （六）稳定性研究资料

稳定性研究资料主要涉及两部分内容，申报产品的稳定性和样本稳定性。前者主要包括实时稳定性（有效期）、开瓶稳定性、复溶稳定性、运输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，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。

另外，还应提供样本保存条件、保存时间等方面的详细研究资料。样本稳定性研究主要包括核酸分离纯化前样本稳定性和分离纯化后核酸在储备液中的稳定性两方面。在合理的温度范围内选择多个温度点（应至少包括范围的上限和下限温度），每间隔一定的时间段对储存样本进行分析验证，从而确认不同类型样本的稳定性。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

### （七）临床研究

#### 1. 临床试验机构的选择

申请人应当选定不少于 3 家（含 3 家）临床试验机构，按照相关规定开展临床试验。申请人应根据产品特点及其预期用途，综合不同地区人种、流行病学背景和病原微生物的特性等因素选择临床试验机构。

2. 临床试验人群：对于仅进行结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测的单功能试剂，选择结核病患者进行临床试验；对于同一注册单元内可同时进行结核分枝杆菌复合群核酸检测以及耐药基因突变检测的双功能试剂，尽管其核酸检测部分的适用人群为疑似结核病患者，但只有核酸阳性才能进行下一步的耐药基因突变检测，因此其耐药基因突变检测部分的适用人群为结核病患者。

3. 临床样本的要求：进行结核分枝杆菌复合群耐药基因突变检测的临床样本应为结核分枝杆菌复合群阳性的样本。结核分枝杆菌复合群阳性的确认方法同本指导原则“二范围”第 3 条。

#### 4. 临床试验样本量

鉴于痰、支气管肺泡灌洗液以及培养物等样本之间差异较大，如果申报产品同时适用于上述几种样本类型，每种样本类型的例数不少于 500 例。

如果申报产品适用于某种样本类型的液体培养物和固体培养物，应进行不少于 150 例液体和固体培养物的同源比对试验（应包括一定数量的阳性和阴性样本），证明不同的培养物不会影响检测结果。

如果某种样本类型适用于几种样本前处理方法，应进行不少于 150 例样本的同源比对试验（应包括一定数量的阳性和阴性样本），证明不同的样本前处理方法不会影响检测结果。

如果某种样本类型适用于几种核酸提取纯化方法，应进行不少于 150 例样本的同源比对试验（应包括一定数量的阳性和阴性样本），证明不同的核酸提取纯化方法不会影响检测结果。

临床试验应尽量采用新鲜样本，如采用冻存样本应另行说明。

#### 5. 对比试剂

##### 5.1 对于已有同类产品上市的申报产品

如果选择已上市同类产品或基因测序作为对比试剂，还需选择至少 200 例样本（敏感和耐药分别至少 100 例）进行传统药敏试验（金标准）的验证。

对于 c 类产品，除了还需选择至少 200 例样本（敏感和耐药分别至少 100 例）进行传统药敏试验（金标准）的验证外，还需对所有耐药/阳性样本采用分子生物学方法进行验证，以明确引

起耐药/阳性的具体突变类型。

如果选择传统药敏试验（金标准）作为对比方法，还需对所有耐药/阳性样本采用分子生物学方法进行验证，以明确引起耐药的具体突变类型。

## 5.2 对于新的结核分枝杆菌复合群耐药基因突检测试剂

对于新的结核分枝杆菌复合群耐药基因突检测试剂，选择传统药敏试验方法（金标准）和基因测序作为对比试剂。

## 5.3 阳性样本例数的要求

对于 a 类和 b 类产品，产品预期用途中声称的每种突变类型均应具有一定的阳性例数，每种突变类型均应分别进行统计分析。对于 c 类产品，应尽量对检测靶核酸区域内的常见突变类型进行验证。

有关测序方法的相关要求，请参考《结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂技术审查指导原则》相关要求以及现行法规要求。

## 6. 临床试验方法、数据及统计分析

6.1 应在临床试验方案或者临床试验报告中详细描述申报产品和对比试剂的具体操作步骤。

6.2 临床试验原始数据应以列表的方式表示，包括样本的申报产品的结果、对比试剂的结果、药敏结果以及耐药比例和临床诊断（如：何种结核病）等。

6.3 对临床试验数据的统计应选择合适的统计方法，如检测结果一致性分析、受试者工作特征（ROC）曲线分析、阴性/阳性符合率等。

6.4 对于申报产品与对比试剂（对比方法）的等效性评价，常选择交叉四格表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。在临床试验方案中应明确统计检验假设，即评价申报产品与对比试剂（对比方法）是否等效的标准。

#### 6.5 结果差异样本的验证

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（测序或药敏试验）或其他合理方法进行复核，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。如无需复核，应详细说明理由。

### 7. 临床试验方案

临床试验实施前，研究者应从流行病学、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试验方案。各临床试验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试验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样本入选/排除标准，任何已经入选的样本再被排除出临床试验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。各临床试验机构选用的对比试剂应保持一致，以便进

行合理的统计学分析。另外，申报产品的样本类型不应超越对比试剂对样本类型的要求。

## 8. 临床试验报告的撰写

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，并应包括必要的数据和统计分析方法。建议在临床试验报告中对以下内容进行详述。

### 8.1 临床试验总体设计及方案描述

8.1.1 临床试验的整体管理情况、临床试验机构选择、临床主要研究人员简介等基本情况介绍。

8.1.2 病例的纳入/排除标准。

8.1.3 样本类型，样本的收集、处理及保存；培养、鉴定、药敏方法等。结核分枝杆菌复合群阳性的确认方法，如采用已获国家食品药品监督管理局批准上市的结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂作为确认方法，应明确生产厂家和医疗器械注册证号等相关信息；如采用传统的培养鉴定方法作为结核分枝杆菌复合群阳性的确认方法，应详细说明培养方法和鉴定方法。

8.1.4 统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。

### 8.2 具体临床试验情况

8.2.1 申报产品和对比试剂的名称、批号、有效期及所用机型等信息。

8.2.2 对各试验机构的病例数等情况进行总合，建议以列表

或图示方式给出具体例数及百分比。

8.2.3 质量控制，试验人员培训、仪器日常维护、质控品运行情况，对检测精密度、质控品测量值的抽查结果评估。

8.2.4 具体试验过程，样本检测、数据收集、样本的保存条件、结果不一致样本的校验等。

### 8.3 统计学分析

8.3.1 数据预处理、差异数据的重新检测或其他合理方法的复核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。

8.3.2 阳性符合率、阴性符合率、总体符合率及其 95%（或 99%）的置信区间。

8.3.3 以交叉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。

### 8.4 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，对本次临床试验有无特别说明，最后得出临床试验结论。

## （八）产品说明书

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》的要求，境外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一致，翻译力求准确且符合中文表达习惯。产品说明书的所有内容均应与申请人提交的其他注册申报资料保持一致，如某些内容引自参考文献，则应采用规范格式对此内

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，下面对结核分枝杆菌复合群耐药基因突变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合理编制说明书。

1. 【预期用途】应至少包括以下几部分内容：

1.1 根据【检验结果的解释】的结果报告形式，【预期用途】第一段可表述为以下几种情况：

1.1.1 申报产品可区分具体突变类型，结果报告具体突变类型（a 类）。建议表述为：本产品用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的 xx 样本中的 yy 耐药基因突变，可检测的突变类型包括 zz，本产品可区分具体突变类型。本产品用于对某种（类）药物耐药的耐药结核病的辅助诊断。

1.1.2 已知申报产品可检测的具体突变类型（如：针对具体突变类型设计特异突变探针，从检验原理上已知可检测哪些突变类型），但结果不区分具体突变类型，结果报告为耐药/敏感等（b 类）。建议表述为：本产品用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的 xx 样本中的 yy 耐药基因突变，可检测的突变类型包括 zz，本产品不区分具体突变类型。本产品用于对某种（类）药物耐药的耐药结核病的辅助诊断。

1.1.3 某段核酸区域的突变可导致对某种药物耐药，申报产品从检验原理上没有必要明确具体突变类型，结果报告为耐药/敏感（c 类）。建议表述为：本产品用于体外定性检测来自结核病患者的结核分枝杆菌复合群阳性的 xx 样本中的 yy 耐药，本产

品无法明确具体突变类型。本产品用于对某种（类）药物耐药的耐药结核病的辅助诊断。

需要特别注意如下几点：

1.b 类预期用途的试剂所包括的突变类型对同一种（类）药物必须具有相同的指导用药的临床意义。

2.对于 c 类预期用途的试剂，申请人必须有充分可靠的科学证据证明某段核酸区域与某种（类）药物具有明确的临床意义。申请人必须提供科学权威的支持资料，证明：耐药基因区域的突变可引起耐药；耐药基因区域的突变对同一种（类）药物必须具有相同的指导用药的临床意义。申请人还应提交耐药基因区域内所有碱基在国内外的突变频率。

1.2 介绍与耐药相关的检测靶标、检测靶标的突变位点和突变类型（如适用）；明确申报产品可检测的突变类型或耐药核酸区域导致的表型耐药占临床所有表型耐药的的比例。

1.3 适用人群：结核病患者。特别注意的是，对于同一注册单元内可同时进行结核分枝杆菌复合群核酸检测以及耐药基因突变检测的双功能试剂，尽管其核酸检测部分的适用人群为疑似结核病患者，但只有核酸阳性才能进行下一步的耐药基因突变检测，因此其耐药基因突变检测部分的适用人群为结核病患者。

1.4 明确临床试验验证过的结核分枝杆菌复合群阳性的确认方法的相关信息。

## 2. 【主要组成成分】

2.1 说明试剂盒包含组分的名称、数量、比例或浓度等信息，

说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。

2.2 试剂盒中不包含但对该项检测必须的组份，企业应列出相关试剂/耗材的名称、货号及其他相关信息。

2.3 如果试剂盒中不包含用于核酸提取纯化的试剂组份，则应在此注明经过验证后配合使用的商品化核酸提取纯化试剂盒的生产企业、产品名称以及产品货号 and 医疗器械备案号（如有）等详细信息。

### 3. 【检验原理】

3.1 对试剂盒检测靶标以及突变类型（如适用）进行详细描述（基因名称和基因位置、靶序列长度、突变类型（如适用）及相关特征等），对试剂盒所用探针、引物、突变或耐药的判定终点等进行详细的介绍；对不同样品反应管组合、对照设置及荧光信号检测原理等进行介绍。

3.2 试剂盒技术原理的详细介绍，建议结合适当图示进行说明。如反应体系中添加了相关的防污染组分（如 UNG 酶），也应对其作用机理进行适当介绍。

### 4. 【储存条件及有效期】

说明试剂盒的效期稳定性、开封稳定性、复溶稳定性、运输稳定性和冻融次数要求等，应明确具体的储存条件及有效期。

### 5. 【样本要求】重点明确以下内容：

5.1 临床样本的收集：建议参照《临床技术规范（结核病分册）》（中华医学会编著）或者《结核病诊断实验室检验规程》（中国防痨协会基础专业委员会编著）现行有效版本推荐的采样

要求或国外的同类文件，并详细描述采样步骤和注意事项。

5.2 临床样本的前处理：建议参考《临床技术规范（结核病分册）》（中华医学会编著）或者《结核病诊断实验室检验规程》（中国防痨协会基础专业委员会编著）现行有效版本推荐的前处理方法或国外的同类文件，详细描述具体的前处理方法。

5.3 培养物样本：详细描述培养鉴定方法，包括：从患者采集的临床样本类型、样本采集后处理、所用培养基、相关药物和具体操作步骤等、申报产品从培养物中取样进行检测的时间点、取样方法和对培养物样本的处理等。

5.4 样本的其他处理、运送和保存：明确核酸提取纯化前的其他处理（如离心和洗涤等）、保存条件及期限（短期和长期）以及运送条件等。冷藏/冷冻样本检测前是否需要恢复至室温，冻融次数的限制等。

6. 【适用仪器】所有适用的仪器型号，并提供与仪器有关的重要信息以指导用户操作。

7. 【检验方法】详细说明实验操作的各个步骤，包括：

7.1 实验条件：实验室分区、实验环境的温度、湿度和空调气流方向控制等注意事项。

7.2 试剂配制方法和注意事项。

7.3 详述待测样本及相关对照核酸提取纯化的条件、步骤及注意事项（如适用）。

7.4 扩增反应前准备：加样体积、顺序等。

7.5 PCR 各阶段的温度、时间设置、循环数设置或相应的自

动化检测程序及相关注意事项。

7.6 仪器设置(如适用):特殊参数、探针的荧光素标记情况、对待测突变及内标和其他对照的荧光通道选择等。

## 8. 【检验结果的解释】

结合阳性对照、阴性对照、内对照、核酸提取纯化对照(如适用)、样本管检测结果以及已验证的突变类型与耐药之间的关系,以列表的形式详述所有可能出现的结果及相应的解释。如存在检测灰区(如:耐药不确定等),应详述对于灰区结果的处理方式。

## 9. 【检验方法的局限性】

9.1 申报产品仅对下述突变类型 **xx** 进行了验证。对于 **c** 类产品,在此处明确境内临床试验做过验证的突变类型。

9.2 申报产品的检测结果仅作为初筛结果,仅供临床参考,用于辅助诊断结核分枝杆菌复合群的耐药性,不应作为患者耐药的确诊依据。临床医生应结合患者病情、药物适应症、疗效及其他实验室检测指标等因素对检测结果进行综合判断。

9.3 本产品仅检测靶标区域内突变引起的耐药。由其他基因或基因区域的突变、以及其他耐药机制引起的耐药本产品不能检出。

9.4 本产品不能用于监测患者对于抗生素的治疗进展以及成功与否,因为经过抗菌治疗后,细菌 **DNA** 可能仍旧存在。

## 9.5 有关假阴性结果的可能性分析

9.5.1 不合理的样本采集、运送及处理、样本中细菌含量过

低、核酸过度降解或扩增反应体系中靶标浓度低于检测限均有可能导致假阴性结果。

9.5.2 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等可能会导致假阴性结果（如有）。

10. 【产品性能指标】 简述以下性能指标：

10.1 对国家参考品检测的符合情况，简要描述采用国家参考品进行检测的结果（如适用）。

10.2 最低检测限：简单介绍最低检测限的确定方法，并明确最低检测限结果。重点考虑原始模板中突变序列的百分率和扩增终体系中核酸浓度两个因素对最低检测限的影响。

10.3 阳性/阴性参考品符合率。

10.4 精密度：简单介绍精密度的确定方法，并明确精密度结果。

10.5 分析特异性

10.5.1 野生型验证：应采用不同浓度的野生型样本进行验证，结果应均为阴性。

10.5.2 可检测突变之间的交叉反应：如申报产品可检测多种突变，还需验证申报产品声称的所有突变类型之间是否存在交叉反应。

10.5.3 干扰物质验证：样本中常见干扰物质对检测结果的影响。

10.6 对比试验研究（如有）：简要介绍对比试剂（方法）的信息、所采用的统计学方法及统计分析结果。

11.【注意事项】应至少包括以下内容：

11.1 如该产品含有人源或动物源性物质，应给出具有潜在感染性的警告。

11.2 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。

#### （九）产品技术要求

产品技术要求应符合《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）的相关规定。申请人应按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》的有关要求，编写产品技术要求，内容主要包含产品性能指标和检验方法，并以附录的形式明确主要原材料、生产工艺及半成品检定要求。

该类试剂的注册检验主要包括以下性能指标：物理性状、阴/阳性参考品符合率、精密度和最低检测限等。阳性参考品主要考察对申报产品覆盖范围内不同突变类型的检测符合性，阴性参考品则重点对申报产品的分析特异性进行验证。

如果申报产品已有相应的国家/行业标准发布，则产品技术要求不得低于国家/行业标准的要求。

#### （十）注册检验

根据《办法》的要求，首次申请注册的第三类产品应该在具有相应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/参考品进行检验，并符合相关要求。对于目前尚无国家标准品/参考品的项目，申请人应建立自己的参考品体系并提供相应的内部参考品。对于 c 类预期用途的产品，如果没有国家参考品，注册检验可采用企业参考品对国内已报告的常见突变类型进行验证。常见突变类型的确定方法可参考本指导原则的“4.1 阳性参考品”。

### 三、名词解释

#### 1. 聚合酶链式反应 **polymerase chain reaction, PCR**

聚合酶链式反应或多聚酶链式反应是一种对特定的 DNA 或 RNA 片段在体外进行快速扩增的方法。由变性—退火—延伸三个基本反应步骤构成。

#### 2. 荧光探针 **PCR**

在 PCR 过程中利用荧光染料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。

#### 3. 分析特异性 **analytical specificity**

测量程序只测量被测量物的能力。分析特异性用于描述检测程序在样本中有其他物质存在时只测量被测量物的能力。通常以一个被评估的潜在干扰物清单来描述，并给出在特定医学相关浓度值水平的分析干扰程度。注：潜在干扰物包括干扰物和交叉反应物。

#### 4. 精密度 **precision**

在规定条件下，相互独立的测试结果之间的一致程度。精密

度的程度是用统计学方法得到的测量不精密度的数字形式表示，如标准差（SD）和变异系数（CV）。

5.最低检测限 **detection limit, limit of detection**

样品中以一定概率可被声明与零有差异的被测量的最低值。

6.阈值循环数 **cycle threshold, Ct**

实时监测扩增过程中，反应管内的荧光信号到达指数扩增时经历的循环周期数。主要的计算方式是以扩增过程前 3 到 15 个循环的荧光值的 10 倍标准差为阈值，当荧光值超过阈值时的循环数则为阈值循环数（Ct）。

7.内标 **internal control** 在同一反应管中与靶序列共同扩增的一段非靶序列分子，其目的是鉴别仪器故障、试剂因素、聚合酶活性因素或样本中存在抑制物等造成的结果不理想的原因。



医课汇  
公众号  
专业医疗器械资讯平台  
WECHAT OF  
HLONGMED



hlongmed.com  
医疗器械咨询服务  
MEDICAL DEVICE  
CONSULTING  
SERVICES



医课培训平台  
医疗器械任职培训  
WEB TRAINING  
CENTER



医械宝  
医疗器械知识平台  
KNOWLEDG  
ECENTEROF  
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM  
医械云专业平台  
KNOWLEDG  
ECENTEROF MEDICAL  
DEVICE