

# 结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂 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特异性细胞免疫反应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。

本指导原则是对结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应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，如不适用，需具体阐述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

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应（即  $\gamma$ -干扰素释放试验，IGRAs）的主要原理：受到结核分枝杆菌抗原刺激致敏的 T 淋巴细胞（T 细胞）再次遇到相同抗原时可产生  $\gamma$ -干扰素，IGRAs

通过检测全血或者分离自全血的外周血单个核细胞（PBMC）在结核分枝杆菌特异性抗原刺激下产生的  $\gamma$ -干扰素，判断受试者是否存在结核分枝杆菌感染。目前，国际上较成熟的 IGRAs 有两种：一是采用酶联免疫吸附实验（ELISA）方法检测全血中致敏 T 细胞再次受到结核分枝杆菌特异性抗原刺激后释放的  $\gamma$ -干扰素水平；二是采用酶联免疫斑点技术（ELISPOT）方法测定在结核分枝杆菌特异性抗原刺激下，外周血单个核细胞中能够释放  $\gamma$ -干扰素的效应 T 细胞数量。

上述两种检测方法的原理类似，检测技术和操作程序略有不同，采用的结核分枝杆菌特异性抗原主要存在于结核分枝杆菌复合群中，在卡介苗和大多数非结核分枝杆菌中缺失。

目前，结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂是指：利用免疫学检测技术，如 ELISA 或 ELISPOT 技术等，以结核分枝杆菌特异抗原刺激 T 细胞产生的  $\gamma$ -干扰素为检测靶标，对人静脉全血中的结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应进行体外检测的试剂，可用于结核分枝杆菌感染的检测或用于结核病的辅助诊断。本指导原则所述内容是针对结核病辅助诊断预期用途的，对于预期用途为结核分枝杆菌感染检测的申报试剂，申请人可以根据产品特性对不适用部分进行修订或补充其他的评价和验证。

本指导原则的技术要求是基于 ELISA 和 ELISPOT 方法建立的，对于其他方法，可能部分要求不完全适用或本文所述技术指标不够全面，申请人可以根据产品特性对不适用部分进行修订或补充其他的评价和验证，但需阐述不适用的理由，并验证替代方

法的科学合理性。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国内外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预期用途、方法学、检验原理、结核分枝杆菌特异性刺激抗原以及最低检测限等方面写明申报试剂与目前市场上已获批准的同类产品之间的主要区别。如所用刺激抗原为新发现的结核分枝杆菌特异性抗原，则应详细论述其能提高该类试剂灵敏度和特异性的科学依据，并提供充分的支持资料。

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总局令第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总局公告2014年第44号，以下简称44号公告）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抗原肽/重组抗原、抗体、阴性对照、阳性对照、标准品（ $\gamma$ -干扰素）、酶以及企业参考品等的选择与来源、制备过程、质量分析和质量控制标准等的研究资料。如主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定；如主要原材料购自其他供应商，应提供的资料包括：供应商提供的质量标

准、出厂检定报告或性能指标证书，以及该原材料到货后的质量检验资料。

企业参考品：申请人应提供企业参考品的详细的来源、制备和确定等资料。

对于采用 **ELISPOT** 方法的申报试剂，企业参考品至少应包括：阴性参考品、阳性参考品和精密度参考品。其中，阳性参考品建议采用结核病患者（菌阴和菌阳）的全血，阴性参考品建议采用健康人和其他易混淆疾病患者的全血，精密度参考品建议采用结核病患者全血。如申请人采用除全血之外的其他样本形式作为企业参考品，请提交申请人所采用的企业参考品的组成、来源、稳定性、延续性、性能可控性等详细的理论和试验数据。

对于采用 **ELISA** 方法的申报试剂，企业参考品至少应包括：阴性参考品、阳性参考品、最低检测限参考品、线性参考品、准确度参考品和精密度参考品等。其中，阴性参考品、阳性参考品和精密度参考品的设置可参考 **ELISPOT** 方法申报试剂的相关要求。最低检测限参考品、准确度参考品和线性参考品，主要考察 **ELISA** 部分的性能，可采用含有  $\gamma$ -干扰素的溶液（建议采用血浆作为基质溶液）。

对于阴性/阳性对照：申报试剂的质控体系通过设置阳性、阴性对照来实现，申报资料应详细描述各种对照的原料选择、制备、定值过程等试验资料。本指导原则的技术要求是基于 **ELISA** 和 **ELISPOT** 方法建立的，对于采用上述方法学的结核细胞类检测试剂，建议至少设置阳性对照和阴性对照。阳性对照一般采用

外周血单个核细胞非特异性刺激物，用于质控外周血单个核细胞功能是否正常，避免产生假阴性。阴性对照用于控制细胞在活化过程中所产生的各种因子的非特异性影响，避免产生假阳性。

标准品（如适用）的选择及质量标准：应详细描述标准品原料的来源、制备、纯度、浓度（或复溶后浓度）、分子量、功能活性等的确定和验证资料。

多肽/重组抗原的选择及质量标准：应详细描述多肽的来源（来自何种抗原）/重组抗原的来源、组成、分子量、纯度、浓度、重组抗原的内毒素含量、刺激活性、特异性等的确定和验证资料。如为冻干抗原，还应设置水分含量的质控标准。

抗体的选择及质量标准：应详细描述抗体的来源、纯度、浓度、分子量、刺激免疫原、效价和功能活性等的确定和验证资料。

### （三）主要生产工艺及反应体系的研究资料

主要生产工艺包括：配制工作液、分装和包装等，可用流程图表示。应提供主要生产工艺的确定依据，包括试验方法和数据等。

反应体系研究资料应能对产品说明书中检验方法部分涉及的基本内容，如样本用量、试剂用量、反应条件等，提供确定的依据，包括试验方法和数据等。

### （四）分析性能评估资料

申请人应提交对申报试剂进行的所有性能验证的研究资料，包括具体的试验方法、内控标准、实验数据和统计分析等。对于结核分枝杆菌细胞免疫反应检测试剂，建议着重对以下分析性能

进行研究。

### 1. 对于采用 **ELISA** 方法的申报试剂

检验方法分为两大部分：（1）将结核分枝杆菌特异性抗原与全血样本共培养，获得含有  $\gamma$ -干扰素的血浆样本；（2）以  $\gamma$ -干扰素标准品做标准曲线，对第（1）步的血浆样本采用 **ELISA** 方法进行定量检测。基于该方法学的分析性能，需要对上述两方面的性能均进行验证。

#### 1.1 最低检测限

申请人可采用合理方法确定和验证申报试剂的最低检测限。建议采用含有系列  $\gamma$ -干扰素稀释浓度的样本，对每个浓度样本进行多次重复检测，选取测定平均 **OD** 值-**2SD** 大于 0 浓度测定平均 **OD** 值+**2SD** 的浓度作为最低检测限浓度。

#### 1.2 线性范围

线性范围确定的研究应使用高值样本（采用血浆基质，采用可溯源至国际校准品的方法对血浆样本中的  $\gamma$ -干扰素进行定量）进行梯度稀释，稀释液应使用血浆，应包含接近最低检测限的临界值浓度。通过评价一定范围内的线性关系确定申报试剂的线性范围。

#### 1.3 准确度

可采用如下方法进行评价，如：与国际标准品的偏差分析、回收试验或者方法学比对等方法，申请人可根据实际情况选择合理方法进行研究。

#### 1.4 分析特异性

### 1.4.1 交叉反应

交叉反应的验证主要考虑全血自身含有的细胞因子或全血刺激培养过程中产生的细胞因子与申报试剂所用  $\gamma$ -干扰素抗体对是否存在交叉反应。需要进行交叉反应验证的细胞因子包括：**IL-1 $\alpha$** 、**IL-1 $\beta$** 、**IL-2**、**IL-3**、**IL-4**、**IL-5**、**IL-6**、**IL-10**、**IL-12**、**TNF $\alpha$** 、**IFN- $\alpha$**  和 **IFN- $\beta$**  等。建议在 0 浓度  $\gamma$ -干扰素水平和中浓度  $\gamma$ -干扰素水平分别进行交叉反应的验证。

同时，建议申请人采用一定数量的其他常见分枝杆菌感染患者的全血样本进行试验，评价申报试剂的特异性。

### 1.4.2 干扰物质

应对全血样本中常见的干扰物质进行验证，包括：抗凝剂、甘油三酯、血红蛋白、胆红素、类风湿因子、抗核抗体、抗线粒体抗体和免疫抑制剂等。建议采用含有不同浓度  $\gamma$ -干扰素的血浆样本分别进行干扰物质的验证，给出不会对  $\gamma$ -干扰素检测值产生干扰的最高干扰物浓度。

## 1.5 精密度

**1.5.1 采用全血样本进行试验的精密度：**分别采用阳性全血样本和阴性全血样本，进行不少于 10 次重复检测，判断检测结果的阴阳性，多次重复检测结果应一致。

**1.5.2 采用含有  $\gamma$ -干扰素的血浆样本进行试验的精密度：**建议在  $\gamma$ -干扰素低浓度和中等浓度 2 个浓度水平分别进行验证。

**1.5.2.1 低浓度样本：** $\gamma$ -干扰素浓度略高于试剂盒的最低检测限 ( $n \geq 20$ )。

1.5.2.2 中等浓度样本：采用中等浓度的样本进行重复检测， $CV \leq 15\%$  ( $n \geq 20$ )。

1.5.3 申请人应设置合理的精密度评价周期，以便对批内/批间以及不同操作者之间的精密度进行综合评价。

### 1.6 阴性参考品符合率

建议选择至少 15 份健康人和其他易混淆疾病患者的全血样本进行试验，上述健康人和患者应包括不同等级的结核菌素（PPD）皮试人群。

### 1.7 阳性参考品符合率

建议选择至少 20 份结核病患者（至少 10 例菌阳，至少 10 例菌阴）全血样本进行试验。

### 1.8 标准品的溯源资料

$\gamma$ -干扰素具有国际标准品，建议检测结果的量值溯源至国际标准品。申请人应提供从国际标准品到产品标准品的溯源链以及各级赋值资料。

## 2. 对于采用 ELISPOT 方法的申报试剂

检验方法为：将结核分枝杆菌特异性抗原与分离的外周血单个核细胞（PBMC）共培养，活化刺激 PBMC 分泌的  $\gamma$ -干扰素被微孔板上包被的单克隆抗体捕获，再用酶标记的另一个单克隆抗体进行反应显色，一个斑点即代表一个细胞，计数斑点的多少，从而判断是否存在结核分枝杆菌特异性的细胞免疫反应。基于该方法学的分析性能，需从下述几个方面进行性能验证。

### 2.1 分析特异性

### 2.1.1 交叉反应

交叉反应的验证主要考虑 PBMC 刺激培养过程中产生的细胞因子与申报试剂所用  $\gamma$ -干扰素抗体对是否存在交叉反应。需要进行交叉反应验证的细胞因子包括：IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12、TNF $\alpha$ 、IFN- $\alpha$  和 IFN- $\beta$  等。建议在 0 浓度  $\gamma$ -干扰素水平和中浓度  $\gamma$ -干扰素水平分别进行交叉反应的验证。

同时，建议申请人采用一定数量的其他常见分枝杆菌感染患者的全血样本进行试验，评价申报试剂的特异性。

### 2.1.2 干扰物质

应对全血样本中常见的干扰物质进行验证，包括：抗凝剂、甘油三酯、血红蛋白、胆红素、类风湿因子、抗核抗体、抗线粒体抗体和免疫抑制剂等。建议采用全血样本进行干扰物质的验证，给出不产生干扰的最高干扰物浓度。

## 2.2 精密度

采用全血样本（包括高斑点数样本、中等斑点数和低斑点数样本）分别进行精密度评价，进行不少于 10 次重复试验，判断检测结果的阴阳性，多次重复检测结果应一致。同时，还应计数检测孔斑点数，计算其 CV 值，CV 值应 $\leq$ 25%。

申请人应设置合理的精密度评价周期，以便对批内/批间以及不同操作者之间的精密度进行综合评价。

## 2.3 阴性参考品符合率

建议选择至少 15 份健康人和其他易混淆疾病患者的全血样本进行试验，上述健康人和患者应包括不同等级的结核菌素（PPD）皮试人群。

#### 2.4 阳性参考品符合率

建议选择至少 20 份结核病患者（至少 10 例菌阳，至少 10 例菌阴）全血样本进行试验。

##### （五）阳性判断值的研究资料

此类试剂的阳性判断值较为复杂，阳性判断值对应产品说明书中“检验结果的解释”部分的内容，申请人应对产品说明书中“检验结果的解释”部分所涉及的各个数值提供详细的确定和验证资料。该部分资料应采用临床样本进行试验，请注意临床样本的选择应与申报产品声称的预期用途相一致。建议采用受试者工作特征（ROC）曲线的方式进行确定。

##### （六）稳定性研究资料

稳定性包括申报试剂稳定性和样本稳定性（包括全血样本稳定性和血浆样本稳定性）。前者主要包括实时稳定性（有效期）、开封稳定性及冻融次数限制（如适用）等。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、详细的研究数据及结论。对于实时稳定性研究，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。

试剂稳定性和样本稳定性两部分内容的研究结果均应在说明书【储存条件及有效期】和【样本要求】两项中进行详细说明。

##### （七）临床试验

临床试验总体要求及临床试验资料的内容应符合《办法》、44号公告和《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》（国家食品药品监督管理总局通告2014年第16号）的规定，以下仅结合结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂的具体特点对其临床试验中应重点关注的内容进行阐述。

### 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，按照法规要求开展临床试验。

### 2. 对比试剂的选择

对于预期用于结核病辅助诊断的申报试剂，申请人可选择境内已批准上市、临床普遍认为质量较好的同类产品作为对比试剂，采用试验用体外诊断试剂（以下称申报试剂）与对比试剂进行比较研究试验，证明本品与已上市产品等效。

### 3. 临床试验对象的选择

对于预期用于结核病辅助诊断的申报产品，临床试验对象应满足：（1）临床试验总病例至少1000例；（2）具有结核病相关体征/症状的疑似结核病患者；（3）最终临床诊断为结核病患者的病例中，应包括肺结核患者和肺外结核患者，并且涂片阴性的肺结核患者占有所有肺结核患者的比例不应小于50%；单纯肺外结核患者至少30例；（4）非结核的其他呼吸道疾病患者以及其他易混淆疾病的患者病例（最终临床诊断不是结核病），包括肺炎、肺癌、支气管炎、支气管扩张、非结核分枝杆菌病、慢阻肺等，其中肺癌至少50例；（5）上述人群应包括PPD阴性和阳

性人群，不能人为选择 **PPD** 阴性人群进行临床试验；（6）各临床试验机构的样本量和样本分布应相对均衡。

全血样本不能冻融，临床试验应采用新鲜样本，样本采集和保存等应满足申报试剂和对比试剂说明书的相关要求。

#### 4. 临床试验方法、临床原始数据及统计分析

4.1 分别依据申报试剂和对比试剂各自的说明书对入组临床样本进行检测，记录结果。

4.2 临床报告中应明确：总样本例数；临床诊断为肺结核患者的总例数，说明涂片阴性和涂片阳性的肺结核患者例数；肺外结核患者的例数，说明各类肺外结核患者的例数；非结核的其他呼吸道疾病患者以及易混淆疾病样本例数，并详细说明各类非结核疾病的患者例数。

4.3 临床原始数据应以列表的方式表示，包括每个病例样本的年龄、性别、临床诊断结果、申报试剂的结果以及对比试剂的结果等。

4.4 对临床试验数据的统计应选择合适的统计方法，如受试者工作特征（**ROC**）曲线分析、阴性/阳性符合率等。常选择四格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，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。

4.5 申报试剂对涂片阴性的肺结核患者和肺外结核患者均应有一定的检出率。

#### 5. 结果差异样本的验证

对于两种试剂检测结果不一致的样本,应采用临床上公认较好的第三方试剂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。

## 6. 临床试验方案

各临床试验机构的方案设置应保持一致,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,申请人的技术人员除进行必要的技术指导外,不得随意干涉试验进程,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。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。

## 7. 其他问题

如果申报试剂的预期用途为结核分枝杆菌感染的检测,申请人应按照法规要求,设置合理的对比方法,选择合适的预期适用人群,进行临床试验。

### (八) 产品技术要求

产品技术要求应符合《办法》和《医疗器械产品技术要求编写指导原则》(国家食品药品监督管理总局通告 2014 年第 9 号)的相关规定。内容主要包含产品性能指标和检验方法,并在附录中明确主要原材料、生产工艺及半成品检定要求。

对于采用 **ELISA** 方法的申报试剂,产品技术要求的性能指

标至少应包括：外观、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率、线性、准确度、最低检测限和精密度等。对于采用 ELISPOT 方法的申报试剂，产品技术要求的性能指标至少应包括：外观、阴性参考品符合率、阳性参考品符合率和精密度。

#### （九）产品注册检验报告

根据《办法》要求，首次申请注册的第三类产品应在具有相应医疗器械检验资质和承检范围的医疗器械检验机构进行连续三个生产批次样品的注册检测。

#### （十）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》（国家食品药品监督管理总局通告 2014 年第 17 号）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注册申报资料中的相关研究结果保持一致。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特异性细胞免疫反应检测试剂说明书的重点内容进行说明。

##### 1. 【预期用途】

应至少包括以下几部分内容：

1.1 本产品用于体外定性检测人新鲜外周静脉抗凝血中结核分枝杆菌特异性的 T 细胞免疫反应，用于结核分枝杆菌感染的检测或者用于结核病的辅助诊断（根据临床试验等研究资料确认预期用途）。

1.2 说明与预期用途相关的临床适应症背景情况，说明相关的临床或实验室诊断方法。

1.3 待测人群特征介绍：具有结核病相关体征/症状的疑似结核病患者、地域要求或年龄限制（如有）等。

## 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分，应列出相关试剂/耗材的名称、货号及其他相关信息。

2.3 申报试剂的注册单元不应包含真空采血管，真空采血管应按相应法规申报注册。

## 3. 【检验原理】

3.1 说明试剂盒所用的刺激抗原/抗原肽（名称、是否多肽抗原/重组抗原），以及所用抗原/抗原肽在卡介苗和非结核分枝杆菌中的存在情况。

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。

## 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、复融稳定性、冻融次数要求（如适用）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 样本的采集：明确所用抗凝剂。

## 5.2 样本的保存:

5.2.1 对于采用 **ELISPOT** 方法的申报试剂, 应明确: 全血样本进行外周血单个核细胞分离前的保存温度与时间; 分离后外周血单个核细胞在与抗原孵育培养前的保存温度与时间。

5.2.2 对于采用 **ELISA** 方法的申报试剂, 应明确: 全血样本在与抗原孵育培养前的保存温度与时间。

## 6. 【检验方法】

该类产品的检测步骤繁多, 应详细描述从全血采集开始到结果判读前的每个步骤, 并明确注意事项。重点关注以下问题: 对于采用 **ELISPOT** 方法的申报试剂, 明确培养时所用外周血单个核细胞的数量以及所用培养基类型。

## 7. 【检验结果的解释】

结合阳性对照、阴性对照以及样本管检测结果, 以列表的形式对所有可能出现的结果组合及相应的解释进行详述, 明确灰区结果的处理方式。

## 8. 【检验方法的局限性】

8.1 本试剂盒的检测结果仅供临床参考, 对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

8.2 有关假阴性结果的可能性分析, 如: 某些免疫功能受损的患者, 可能导致假阴性。

8.3 有关假阳性结果的可能性分析, 如: 与其他分枝杆菌是否存在交叉反应。

## 9.【产品性能指标】

9.1 最低检测限（如适用）：说明试剂的最低检出浓度，简单介绍最低检测限的试验方法及结果。

9.2 企业阴阳性参考品的检测符合情况：简单介绍阴阳性参考品的组成和符合率结果等信息。

9.3 精密度：明确精密度参考品的组成及结果。

### 9.4 分析特异性

9.4.1 交叉反应：明确可能产生交叉反应的其他细胞因子的验证情况。

9.4.2 干扰物质：明确样本中常见干扰物质对检测结果的影响。

9.5 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。

9.6 境外（如适用）和境内临床试验数据总结。

# 《结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂注册技术审查指导原则》编制说明

## 一、编制背景

结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应检测试剂是指利用免疫学检测技术，如 ELISA 或 ELISPOT 技术等，以结核分枝杆菌特异抗原刺激 T 细胞产生的  $\gamma$ -干扰素为检测靶标，对人静脉全血中的结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应进行体外检测的试剂，可用于结核分枝杆菌感染的检测或用于结核病的辅助诊断。

本指导原则所述内容是针对结核病辅助诊断预期用途的，对于预期用途为结核分枝杆菌感染检测的申报试剂，申请人可以根据产品特性对不适用部分进行修订或补充其他的评价和验证。

## 二、重点问题的说明

### （一）企业参考品的组成和样本类型

目前，该类试剂采用全血样本作为检测样本类型，所涉及的方法学包括：ELISPOT 和 ELISA。针对企业参考品的样本类型，考虑到全血样本的不可冻存性和该类试剂质控的关键点，指导原则建议：如申请人采用除全血之外的其他样本形式作为企业参考品，应提交申请人所采用的企业参考品的组成、来源、稳定性、延续性、性能可控性等详细的理论和试验数据。

针对企业参考品的组成，由于 ELISPOT 方法是在全血细胞培养后，直接在固体基质表面形成斑点，计数斑点判断结果，理

论上可计数一个斑点。但在实践时，很难保证获取的全血样本刚好形成一个斑点，因此，采用该方法学的试剂仅需要设置阴性参考品、阳性参考品和精密度参考品。而 ELISA 方法是在全血培养后，吸出血浆上清，检测上清中的干扰素的含量，因此，采用该方法学的此类试剂需要设置培养阶段和干扰素 ELISA 检测阶段参考品，包括：阴性参考品、阳性参考品、线性参考品、最低检测限参考品和精密度参考品等。

## （二）分析性能评估相关问题

### 1.最低检测限的要求与方法

采用 ELISPOT 方法的试剂，理论上可计数到一个斑点，因此理论上其最低检测限为 1 个斑点，但现实中通过试验证明该类试剂的最低检测限为 1 个斑点具有很大困难，难以实现。因此，参考美国 FDA 已批准同类试剂的要求，经讨论后，对 ELISPOT 方法学的此类试剂，无需进行最低检测限的验证。

采用 ELISA 方法的试剂，最低检测限检测的是血浆样本中干扰素的最低含量。指导原则建议，申请人可根据自己的研发平台，设置科学合理的方法，进行最低检测限的试验。

### 2.精密度的要求与方法

采用 ELISPOT 方法的试剂，精密度必须采用全血进行试验，方可模拟整个检测过程。在讨论日间精密度时，企业和相关专家均提出，因为全血样本无法冻存，无法在不同的自然天内进行日间精密度的研究。同时，现有认知水平下，也无科学合理的替代方法来进行日间精密度的研究，因此，对此类试剂不做日间精密

度的要求。

采用 ELISA 方法的试剂，精密度不仅需要考察全血培养阶段的精密度，而且需要考察 ELISA 检测部分对干扰素含量检测的精密度，前者可参考 ELISPOT 方法的相关要求和方法，后者参考常见 ELISA 方法检测试剂的要求和方法。

### 3.交叉反应的要求与方法

采用 ELISPOT 方法和 ELISA 方法的试剂，尽管结果的判读方式存在差异，但其检验原理均是采用特异性的  $\gamma$ -干扰素抗体，检测 T 细胞刺激活化后分泌的  $\gamma$ -干扰素。因此，此类试剂的交叉反应性，主要考虑全血自身含有的细胞因子或全血刺激培养过程中产生的细胞因子与申报试剂所用  $\gamma$ -干扰素抗体对是否存在交叉反应。

如果在全血样本的培养过程中加入可能产生交叉反应的细胞因子，势必会影响 T 细胞在培养过程中的功能和活性，最终影响 T 细胞分泌  $\gamma$ -干扰素的能力，影响对结核分枝杆菌特异性细胞免疫反应的检测。因此，对于该类试剂，不管是采用何种方法，交叉反应的研究都是采用血浆或其他基质检测细胞因子对  $\gamma$ -干扰素抗体对的交叉反应性。

### （三）产品预期用途

该类试剂的检测原理可检测结核分枝杆菌的感染，包括活动性结核感染（结核病）和潜伏感染。但是，因为潜伏感染的诊断在全世界均无金标准，而且中国人出生就接种卡介苗，导致对潜伏感染预期用途的临床验证目前缺乏有效的对比方法，因此，目

前申请人申报该类试剂的预期用途基本用于结核病的辅助诊断。本指导原则针对结核病辅助诊断预期用途的临床试验要求，给出了较为详细的建议，并经专家和企业讨论后，达成了一致意见。

同时，指导原则也明确，如果申请人对该类试剂的预期用途设定为结核分枝杆菌感染的检测，需提供足够的临床证据支持该声称。

#### （四）临床试验相关问题

##### 1. 样本入组相关要求

针对结核病辅助诊断的预期用途，指导原则在临床试验样本入组方面做了较为详细的说明。申报试剂应选择疑似结核患者进行检测，以模拟临床实际使用情况。临床使用中，该类试剂不仅用于肺结核的辅助诊断，还可用于肺外结核的辅助诊断，因此，指导原则对单纯肺外结核的样本例数也给出了最低要求。鉴于临床实践和研究证明，肺癌患者是一类与 $\gamma$ -干扰素相关的癌症，因此，规定了肺癌患者的最低样本例数，以考察该类试剂的特异性。

##### 2. 临床特异性的相关要求

指导原则初稿时，对申报试剂的临床特异性做出了不低于75%的要求。后经专家和企业反复讨论后删除了这一要求，原因有以下几点：第一，该类试剂已有多个同类产品在国内外批准上市，按照法规要求，可选择已上市同类试剂，验证该类试剂的检测准确性；第二，该类试剂的临床特异性受临床试验受试人群的年龄、性别以及区域的影响较大，而且目前并无大量流行病学的调查数据支持75%的声称，因此，临床特异性无法给出具体要求。

### 三、编写单位

国家食品药品监督管理总局医疗器械技术审评中心。



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