附件

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂

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核酸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审评注册申报资料提供参考。

本指导原则是对结核分枝杆菌复合群核酸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。

本指导原则是供申请人和审查人员使用的指导文件，不涉及注册审批等行政事项，亦不作为法规强制执行，如有能够满足法规要求的其他方法，也可以采用，但应提供详细的研究资料和验证资料。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、标准体系及当前认知水平下制定的，随着法规、标准的不断完善和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
　 结核病是由结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌和非洲分枝杆菌等引起的慢性传染性疾病，可累及全身各个器官，以肺结核最为多见。其中，结核病的病原菌主要是结核分枝杆菌，牛结核分枝杆菌次之。结核分枝杆菌主要是经空气传播，大多数人在感染结核分枝杆菌后并无症状，称为潜伏感染。潜伏感染可持续几十年，仅有5%—10%的潜伏感染者发展为活动性肺结核。

在结核病的细菌学检验中，通常将分枝杆菌分为结核分枝杆菌复合群（Mycobacterium tuberculosis complex）和非结核分枝杆菌（Nontuberculosis mycobacteria, NTM）。结核分枝杆菌复合群包括结核分枝杆菌（M.tuberculosis）、牛结核分枝杆菌(M.bovis)、非洲分枝杆菌（M.africanum）和田鼠分枝杆菌（M.microti）。在结核分枝杆菌复合群内各种中，除田鼠分枝杆菌对人无致病力外，其他三种菌均可对人致病，产生大致相同的临床表现。因此，临床上往往只做结核分枝杆菌复合群的鉴定而不进行亚种水平的鉴定，用于结核辅助诊断的核酸检测试剂也常采用结核分枝杆菌复合群共有的核酸序列作为靶标来进行检测。

核酸检测是肺结核病原学诊断的重要参考。2009年，美国疾病控制预防中心（CDC）更新了肺结核的诊疗指南，将核酸检测作为肺结核的辅助诊断方法，明确：对所有疑似肺结核患者，应至少进行一个呼吸道样本的核酸检测。我国《临床诊疗指南—结核病分册》也明确：结核分枝杆菌的DNA检测可作为肺结核诊断的参考。与其他实验室检查方法比较，核酸检测的价值在于：（1）可快速鉴别结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌，提高涂片阳性肺结核的诊断特异性；（2）与涂片比较，灵敏度较高，可提高涂片阴性肺结核的检出率；（3）与培养相比，操作快速，可及早进行正确的医疗处置。

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂是指：利用分子生物学检测技术，如聚合酶链式反应（PCR）等，以特定的结核分枝杆菌复合群共有的核酸序列为检测靶标，对痰、支气管肺泡灌洗液中的结核分枝杆菌复合群进行体外定性检测的试剂，用于肺结核的辅助诊断。

本指导原则的技术要求是基于荧光探针PCR方法建立的，对于其他分子生物学检测技术，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。

本指导原则适用于以结核分枝杆菌复合群共有的靶核酸序列作为靶标进行检测的试剂，对于某些以结核分枝杆菌特有的靶核酸序列为靶标进行检测的试剂，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。

本指导原则适用于预期用途为肺结核辅助诊断的、以痰或支气管肺泡灌洗液作为适用样本类型的结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂。对于用途相同的其他呼吸道样本类型，或者预期用途为肺外结核辅助诊断的结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂，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。

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方法学、检验原理、最低检测限及被测靶核酸序列的特性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。若被测物为新的靶核酸序列，则应详细论述作为检测靶标的核酸序列的临床意义，即其与临床应用（可用于肺结核辅助诊断）的相关性，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）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、酶、阴性对照、阳性对照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。若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货商，应提供的资料包括：供货商提供的质量标准、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。

申请人应提供企业参考品的详细制备过程，包括组成、来源、菌株特性（如名称、种属、靶核酸的拷贝数、浓度等）等信息。企业参考品的项目应包括：阴性参考品、阳性参考品、最低检测限参考品、重复性参考品等。阳性参考品应着重考虑结核分枝杆菌复合群的代表菌株，阴性参考品则主要涉及对分析特异性（交叉反应）的验证情况。建议采用灭活的菌株建立企业参考品，不宜采用质粒、菌株的基因组提取/纯化物等核酸或临床样本（如痰液）。

申报试剂的质控体系通过设置阳性、阴性、内对照（内标）等各种对照来实现，需考虑对样本核酸提取/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、靶核酸降解等因素可能造成的假阴性或假阳性结果的质量控制。阳性对照的核酸性质应与待测样本的核酸性质一致，如同为RNA或DNA。企业应对各种对照的Ct值或相应判断数值做出明确的范围要求。申报资料应详细描述对照的原料选择、制备、定值过程等试验资料。

本指导原则的技术要求是基于荧光探针PCR方法建立的，对于采用该方法学的结核核酸检测试剂，建议至少设置阳性对照、阴性对照和内对照。

1.内对照（内标）

内对照可对实验过程可能存在的扩增反应抑制物、仪器、试剂和操作等所导致的假阴性结果进行质量控制。内对照可采用不含靶核酸序列的质粒或线性DNA、非结核分枝杆菌复合群的病原体或克隆菌株，靶核酸为RNA时可采用假病毒等。申请人应对内对照（内标）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曲线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。

2.阳性对照

阳性对照可对实验过程进行质控。阳性对照可为：含有靶核酸序列的核酸、含有靶核酸序列的结核分枝杆菌复合物菌株或其他克隆菌株，靶核酸为RNA时可采用假病毒等。企业应对各种阳性对照的Ct值或相应判断数值做出明确的范围要求。

3.阴性对照

阴性对照对可能存在的交叉污染进行假阳性结果的质控。阴性对照可以是空白对照。阴性对照需参与样本核酸的平行提取/纯化。

由于申报试剂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，从而影响后续试验结果，造成假阴性的可能性。因此，申报试剂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，或者采用菌株作为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。

4.核酸提取/纯化组分（如适用）的主要组成、原理介绍及相关的验证资料。

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

5.1脱氧三磷酸核苷（dNTP）

核酸的组成成分，包括：dATP、dUTP、dGTP、dCTP和dTTP，对纯度、浓度、保存稳定性等的详细验证资料。

5.2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。需提供对序列准确性、纯度、稳定性、功能性实验等的验证资料。如为外购，应提供合成机构出具的合成产物的质检证明，如PAGE电泳结果或高效液相色谱法（HPLC）分析图谱。

5.3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PAGE或其他适宜方法纯化，在5'-端(和/或3'-端)进行标记，如荧光素报告基团或其他发光标记物，在3'-端标记荧光素淬灭基团，并经HPLC或其他适宜方法纯化，纯度应达到高效液相色谱纯。如为外购，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；应对探针的核酸序列及标记的荧光素或化学发光物进行核实，并作HPLC分析。

5.4 PCR反应所需酶

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；尿嘧啶糖基化酶（UNG），具有尿嘧啶糖基化活性，无核酸外切酶及核酸内切酶活性，应对酶活性有合理验证；应提供有关保存稳定性、活性及功能实验等的验证资料。

6.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）或核糖核酸酶（Rnase）污染。

（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、半成品检定、分装和包装。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、电导率等关键参数进行有效控制。
　　生产工艺研究资料应能对反应体系涉及到的基本内容，如样本用量、试剂用量、反应条件、质控体系设置、Ct（临界）值确定等，提供确切的依据，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.反应原理介绍。
　　3.基因序列的选择、PCR方法学特性介绍。

4.核酸提取/纯化方法确定的研究资料。

5.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、阳离子浓度、样本量及反应体积等。
　　6.确定PCR反应各阶段温度、时间及循环数的研究资料。
　　7.对于基线阈值（threshold）和阈值循环数（Ct）确定的研究资料。
 （四）分析性能评估资料
　　企业应提交在产品研制阶段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（操作步骤）、内控标准、实验数据、统计分析等详细资料。对于结核分枝杆菌复合群核酸定性检测试剂，建议着重对以下分析性能进行研究。

1.最低检测限（分析灵敏度）

1.1最低检测限的确定

建议使用结核分枝杆菌标准菌株、牛结核分枝杆菌标准菌株或BCG标准菌株（如适用）的梯度稀释液来确定最低检测限。每个梯度进行不少于20次的重复检测，将具有95%阳性检出率的菌株浓度作为最低检测限。应明确每份菌株的来源、基因型特性、浓度、制备方法等信息。企业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。

为确定痰样本的最低检测限，建议将已知浓度的菌株与结核分枝杆菌复合群阴性的痰样本进行混合，完全按照申报试剂的操作步骤对此“制备痰液”进行样本前处理、核酸提取/纯化、扩增等。对结核分枝杆菌复合群阴性痰样本的确认，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。最低检测限的浓度应是“制备痰液”的最终菌株浓度。

1.2最低检测限的验证

应在最低检测限的菌株浓度对结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌或BCG菌株（如适用）进行至少20次的重复试验验证，每种菌株的阳性检出率为95%。企业应能够提供用于最低检测限验证的各个菌株的来源、制备方法及浓度等信息。“最低检测限的验证”的试验方法可参考“最低检测限的确定”。

2.分析特异性

2.1交叉反应

用于结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂交叉反应验证的病原体种类主要考虑以下几方面：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。主要包括：非结核分枝杆菌复合群（NTM）、常见的口腔和呼吸道共生的病原体等，具体目录参见表1和表2。

建议在病原体感染的医学相关水平进行交叉反应的验证。建议进行交叉反应验证的分枝杆菌、细菌或者真菌的最低浓度为106 CFU/mL；进行交叉反应验证的病毒的最低浓度为105 PFU/mL（plaque forming unit，PFU，空斑形成单位）。应提供用于交叉反应验证的病原体的制备方法、来源、种属和浓度等信息。

对于某些难以培养或者因为生物安全性无法培养的病原体，可采用病原体核酸样本进行交叉反应的验证。应提供用于交叉反应验证的病原体核酸的来源、组成和浓度等信息。采用病原体核酸样本进行试验时，应将核酸样本视为实际使用过程中参与PCR反应的核酸样本，根据试剂说明书的要求配制PCR反应体系，进行扩增。

有关交叉反应验证的信息应以列表的方式在产品说明书的【产品性能指标】项中体现。

表1 用于交叉反应研究的其他分枝杆菌

（非结核分枝杆菌复合群的其他分枝杆菌）

|  |  |
| --- | --- |
| 堪萨斯分枝杆菌 | 苏加分枝杆菌 |
| 海分枝杆菌 | 龟分枝杆菌 |
| 土地分枝杆菌 | 偶发分枝杆菌 |
| 次要分枝杆菌 | 耻垢分枝杆菌 |
| 溃疡分枝杆菌 | 脓肿分枝杆菌 |
| 戈登分枝杆菌 | 胃分枝杆菌 |
| 蟾蜍分枝杆菌 | 胞内分枝杆菌 |
| 鸟分枝杆菌 | 草分枝杆菌 |
| 瘰疬分枝杆菌 |  |

注:表中所列细菌均应进行验证。

表2 用于交叉反应研究的其他病原体

|  |  |
| --- | --- |
| 肺炎链球菌 | 金黄色葡萄球菌 |
| 流感嗜血杆菌 | 诺卡氏菌 |
| 大肠杆菌 | 绿脓杆菌 |
| 表皮葡萄球菌 | 白色念珠菌 |
| 隐球菌 | 人类副流感病毒（1、2和3型） |
| 人流感病毒（A型和B型） |  |

注:表中所列病原体均应进行验证。

2.2干扰物质

潜在的干扰物质主要包括：内源性物质（如血液、粘液、人细胞等）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，另外，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。

表3 用于干扰研究的外源性药物

|  |  |
| --- | --- |
| 异烟肼 | 乙胺丁醇 |
| 利福平 | 吡嗪酰胺 |
| 卡那霉素 | 链霉素 |
| 抗生素（如：阿莫西林、左氧氟沙星） | 抗病毒药（如：扎那米韦） |
| 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） |
| 鼻用软膏类（如：莫匹罗星） |  |

注: 表中所列外源性药物均应进行验证，括号内至少选做一种。

3.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合理性。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，如标准差或变异系数的范围等。针对申报试剂的精密度评价主要包括以下要求。

3.1对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除申报试剂（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、地点等要素进行相关的验证。

3.2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。

3.3建议采用结核分枝杆菌标准菌株（“3.3.1阴性样本”不适用）作为样本，在以下3个浓度水平进行验证：

3.3.1阴性样本：不含结核分枝杆菌标准菌株的样本，阴性检出率应为100%（n≥20）。
　 3.3.2弱阳性样本：结核分枝杆菌标准菌株浓度略高于试剂盒的最低检测限，阳性检出率应高于95%（n≥20）。

3.3.3中等阳性样本：结核分枝杆菌标准菌株浓度约为最低检测限的2倍或3倍，阳性检出率为100%且CV≤15%（n≥20）。

4.反应性（包容性）

应证明申报试剂可以检测代表不同基因多态性的结核分枝杆菌复合群菌株。应至少对结核分枝杆菌、牛结核分枝杆菌或BCG菌株(如适用)、非洲分枝杆菌和田鼠分枝杆菌进行验证。应采用略高于最低检测限浓度的结核分枝杆菌复合群菌株进行研究。应提供各个菌株的来源、菌株特性及浓度等信息。应证明所有采用的菌株含有靶核酸序列。

5.不同样本类型、样本前处理方法、核酸提取/纯化方法的分析性能资料要求

由于痰和支气管肺泡灌洗液样本之间差异较大，如申报试剂同时包括这两种样本类型，申请人应提交每种样本类型的全项目分析性能评估资料。

对于每种样本类型而言，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会影响检测结果。

对于每种样本类型而言，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性项目），以证明不同的核酸提取/纯化方法不会影响检测结果。

如果申报试剂同时适用于几种不同的临床样本类型、样本前处理方法和核酸提取/纯化方法，每种样本类型应明确其适用的样本前处理方法（一种或几种）和核酸提取/纯化方法（一种或几种）。如果申报试剂最终仅保留某种样本类型、某种样本前处理方法和某种核酸提取/纯化方法，分析性能评估资料应采用该组合进行。

6.注意事项

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）曲线的方式确定申报试剂用于结果判断的临界值。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的研究资料。

（六）稳定性研究资料
　 稳定性研究资料主要涉及两部分内容，申报试剂的稳定性和适用样本的稳定性研究。前者主要包括实时稳定性（有效期）、运输稳定性、开封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。

申请人应对样本稳定性进行研究，主要包括冷藏和冷冻两种条件下的有效期验证，可以在合理的温度范围内选择3—5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性能验证，从而确认不同类型样本的效期稳定性。用于样本稳定性研究的样本应包括最低检测限浓度的样本。除了定性结果之外，还需要提供原始信号的分析，如Ct。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

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

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，按照有关规定开展临床试验。临床试验机构应获得国家食品药品监督管理总局资质认可。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、病原微生物的特性等因素选择临床试验机构。临床试验机构必须具有与申报试剂相适应的专业技术人员及仪器设备，并能够确保该项试验的实施。

2.临床试验样本的选择和样本量

临床试验对象的选择应满足如下条件：（1）具有肺结核症状/体征的疑似肺结核患者病例，不建议选择正常健康人群；（2）最终临床诊断为肺结核患者的病例不少于350例，并且涂片阴性的肺结核患者占所有肺结核患者的比例应不小于50%；（3）应包括其他易混淆疾病的病例（最终临床诊断确定不是肺结核），以对申报试剂的特异性进行评价，此部分病例不少于150例；（4）每个临床试验对象的临床样本应足量，以便同时进行申报试剂、对比试剂和其他合理方法的检测。

鉴于痰和支气管肺泡灌洗液样本之间的差异较大，如果申报试剂同时适用于两种样本类型，每种样本类型的例数不少于500例。

临床试验应以新鲜样本为主，如采用冻存样本应另行说明。

如果某种样本类型适用于多种样本前处理方法，应进行不少于150例同源样本的对比试验，证明不同的样本前处理方法不会影响检测结果。其中，最终临床诊断为肺结核患者的病例不少于100例，涂片阴性的肺结核患者占所有肺结核患者的比例不小于50%，其他易混淆疾病的病例（最终临床诊断确定不是肺结核）不少于50例。

如果某种样本类型适用于多种核酸提取/纯化方法，应进行不少于150例同源样本的对比试验，证明不同的核酸提取/纯化方法不会影响检测结果。其中，最终临床诊断为肺结核患者的病例不少于100例，涂片阴性的肺结核患者占所有肺结核患者的比例不小于50%，其他易混淆疾病的病例（最终临床诊断确定不是肺结核）不少于50例。

3.对比试剂的选择

3.1对于“已有同品种批准上市”试剂的临床试验，申请人可按照法规要求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或优于已上市产品。同时，申请人还应选择一定数量的临床样本进行申报试剂与培养鉴定方法的对比研究，每种样本类型不少于100例，其中涂片阴性和阳性各至少50例。培养方法可采用传统的固体培养方法或临床普遍认可的液体培养方法，菌种鉴定方法可采用对硝基苯甲酸（p-methylbenzylsulfonyl，PNB）、测序、高性能的液相层析、质谱、或其他已上市的核酸检测试剂盒方法。临床研究报告应对采用的培养鉴定方法做详细介绍。

3.2对于无法选择对比试剂的新结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂，其临床试验应选择培养鉴定和/或核酸序列测定（测序）方法作为对比方法，总例数不少于500例。

3.2.1 有关培养鉴定方法的要求同3.1。

3.2.2 临床研究报告应对选用的测序方法做详细介绍。申请人应提供以下关于测序部分的详细试验资料，需由临床试验机构签章确认。

3.2.2.1测序方法原理、测序仪型号、测序试剂及消耗品的相关信息。

3.2.2.2测序方法所用引物相关信息，如核酸序列选择、分子量、纯度、功能性实验等资料。引物设计应合理涵盖申报试剂扩增的靶核酸区段。

3.2.2.3 对所选测序方法的分析性能进行合理验证，尤其是最低检测限的确认，建议将所选测序方法与申报试剂的相关性能进行适当比对分析。

3.2.2.4 测序方法应建立合理的阳性和阴性质控品，以对临床样本的检测结果进行质量控制。

3.2.2.5 提交有代表性的样本测序图谱及结果分析资料。

如果申报试剂同时适用于几种不同的临床样本类型、样本前处理方法和核酸提取/纯化方法，每种样本类型应明确规定其适用的样本前处理方法（一种或几种）和核酸提取/纯化方法（一种或几种）。如果申报试剂最终仅保留某种样本类型、某种样本前处理方法和某种核酸提取/纯化方法，临床试验应采用该组合进行。

4.临床试验方法、临床数据及统计分析

4.1应在临床试验方案或者临床试验报告中详细描述申报试剂和对比试剂的具体操作步骤。应明确每个试验阴阳性的判定标准，特别应明确何为培养鉴定的阴阳性。

4.2在临床报告中，以列表的方式，明确：总样本例数、临床诊断为肺结核的患者总例数、涂片阴性的肺结核患者例数、涂片阳性的肺结核患者例数、非结核的其他呼吸道疾病患者与易混淆疾病样本例数，以判断病例选择的科学合理性。

4.3临床试验数据应以列表的方式表示，包括每个样本的涂片结果、临床诊断结果、申报试剂的结果、对比试剂的结果。

4.4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。

4.5申报试剂对涂片阴性的肺结核患者应有一定的检出率；申报试剂对涂片阳性肺结核患者的检出率至少为90%；申报试剂的临床特异性至少为90%。

4.6临床试验中的某些样本，采用申报试剂检测时为阳性，采用培养鉴定方法检测时为阴性，出现这种情况的原因有：样本前处理导致结核菌的培养受抑制；样本中结核菌的浓度过低。这可能导致申报试剂的特异性低。因此，在进行4.4统计分析的同时，建议进行申报试剂与最终临床诊断的对比统计分析，以客观地反应申报试剂的临床特异性。

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

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。

6.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，申报试剂的样本类型不应超越对比试剂对样本类型的检测要求。

7.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，临床试验报告应该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，并应包括必要的基础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。

7.1临床试验总体设计及方案描述

7.1.1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。

7.1.2病例的纳入/排除标准。

7.1.3样本类型，样本的收集、处理及保存；痰液的培养、鉴定方法；培养鉴定阴性、阳性的具体涵义等。

7.1.4统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。

7.2具体临床试验情况

7.2.1申报试剂和对比试剂的名称、批号、有效期及所用机型等信息。

7.2.2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。

7.2.3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。

7.2.4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。

7.3统计学分析

7.3.1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。

7.3.2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。

7.3.3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。

7.4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）产品技术要求

产品技术要求应符合《办法》和《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》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，并在附录中明确主要原材料、生产工艺及半成品要求。

产品技术要求中的产品性能指标应与说明书中相关内容保持一致。如申报试剂已有相应的国家或行业标准发布，则产品技术要求不得低于上述标准要求。

（九）注册检验

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。如申报试剂有适用的国家参考品，应采用国家参考品进行注册检验，并符合国家参考品的相关要求。

（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》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，如某些内容引用自参考文献，则应以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核酸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更合理地编制说明书。

1.【预期用途】应至少包括以下几部分内容：

1.1试剂盒用于体外定性检测人xx样本中的结核分枝杆菌复合群核酸。

1.2简单介绍结核分枝杆菌复合群包括哪些种的细菌、致病性、感染后的临床表现，靶核酸序列的特征（名称和基因位置等）及选择依据，其他病原体（如：非结核分枝杆菌NTM）中是否存在靶核酸序列。

1.3待测人群特征介绍：具有肺结核相关体征/症状和X线检查结果的疑似结核病患者、地域要求或年龄限制（如有）等。

1.4强调：实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备相应的生物安全防护条件。

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推荐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、医疗器械注册证号等详细信息。

3.【检验原理】

3.1对试剂盒检测的靶核酸序列进行详细描述（名称和基因位置等），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逐项介绍。

3.2核酸提取/纯化方法、原理等。

3.3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），也应对其作用机理作适当介绍。

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、复融稳定性、运输稳定性、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样本的收集：应参照《临床技术操作规范（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，并详细描述采样步骤和注意事项。

5.2临床样本的前处理（如适用）：应参考《临床技术操作规范（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，尤其是痰标本，如碱处理-直接法、N-乙酰-L-半胱氨酸（NALC）-NaOH法等，详细描述具体的前处理方法。

5.3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、洗涤等）、保存条件及期限（短期、长期）、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。

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、空调气流方向控制等注意事项。

7.2试剂配制方法、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：特殊参数、结合探针的荧光素标记情况、对待测基因及内标的荧光通道选择。

7.7基线、循环阈值（Ct值）的选择方法或相应的自动化检测程序。

8.【检验结果的解释】

结合阳性对照、阴性对照、内对照（内标）、核酸提取/纯化对照（如适用）以及样本管检测结果的Ct值，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。如存在检测灰区，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。

9.2有关假阴性结果的可能性分析

9.2.1不合理的样本采集、运送及处理、样本中细菌含量过低均有可能导致假阴性结果。

9.2.2待测靶核酸的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。

9.2.3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）。

9.3有关假阳性结果的可能性分析

除结核分枝杆菌复合群外，其他病原体可能含有靶核酸序列，因而导致假阳性，列出可能导致假阳性结果的病原体目录。

10.【产品性能指标】详述以下性能指标：

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：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。

10.3企业阳性、阴性参考品的检测符合情况，简单介绍阴阳性参考品的组成、浓度和符合率结果等信息。

10.4精密度：精密度参考品的组成、浓度及结果。

10.5分析特异性

10.5.1交叉反应：对出现在相应临床标本中可能产生交叉反应的其他病原体的验证情况，建议以列表的方式明确经过交叉反应验证的病原体名称、菌株特性、浓度等信息；

10.5.2干扰物质：样本中常见干扰物质对检测结果的影响，如血液、粘液或药物等；

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。

10.7境外（如适用）和境内临床试验数据总结。

11【注意事项】应至少包括以下内容：

11.1有关人源组份（如有）的警告，如：试剂盒内xx组份可能含有人源物质，虽已经通过了HBs-Ag、HIV1/2-Ab、HCV-Ab等项目的检测，但截至目前，没有任何一项检测可以确保绝对安全，故仍应将这些组分作为潜在传染源对待。

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。

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。