结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂注册审查

指导原则（2023修订版 征求意见稿）

本指导原则旨在指导注册申请人对结核分枝杆菌复合群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对注册申报资料的审查提供参考。

本指导原则是对该类试剂注册申报资料的一般要求，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。如注册申请人认为有必要增加本指导原则不包含的研究内容，可自行补充。

本指导原则是供注册申请人和技术审评人员使用的指导性文件，但不包括注册审批所涉及的行政事项，亦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。需在遵循相关法规和强制性标准的前提下使用本指导原则。

本指导原则是在现行法规、标准体系以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、适用范围  
　 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*）、羊结核分枝杆菌（*M.caprae）*和田鼠分枝杆菌（*M.microti*）等。临床上通常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。

本指导原则适用于采用分子生物学检测技术，如聚合酶链式反应（PCR）等，以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、胸腔积液中的结核分枝杆菌复合群进行体外定性检测的试剂，用于结核的辅助诊断。对于预期用途相同的其他样本类型，或者预期用途为其他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。本指导原则适用于结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂注册申请和变更注册申请的情形。本指导原则针对结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂注册申报资料中的部分内容进行撰写，其他未尽事宜应当符合《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》等相关法规要求。

二、注册审查要点

（一）监管信息

1.产品名称及分类编码

产品名称应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》及相关法规的要求，如结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）。根据《体外诊断试剂分类子目录》，与致病性病原体抗原、抗体以及核酸等检测相关的试剂管理类别为三类，分类编码为6840。

2.其他信息

还包括产品列表、关联文件、申报前与监管机构的联系情况和沟通记录以及符合性声明等文件。

（二）综述资料

综述资料主要包括概述、产品描述、预期用途、申报产品上市历史及其他需说明的内容。应详细说明产品所采用的技术原理及检测流程。提供不同适用机型的检测通量，即一次检测最多可检测的样本数。提供核酸提取（手工和自动提取方式应分别明确）和PCR扩增的时间，以及检测全过程所需的时间。不同检测流程，分别提供最少和最多检测样本量下的检测时间。与已上市同类产品进行比较，比较内容包括样本类型，检测原理，检测靶基因，组成成分，内标，质控品，判读规则，分析性能和临床性能等。

预期用途中明确产品检测的靶基因，需选择保守性和特异性相对较高的基因，同时还应考虑基因的扩增效率。检测靶基因的选择应提供相关指南或文献，并分析所检测基因的灵敏度和特异性是否符合临床需求。

（三）非临床资料

1.产品技术要求及检验报告

注册申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下，根据产品研制、前期评价等结果，依据国家标准、行业标准及有关文献资料，结合产品特性按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》的要求编写。该类产品作为第三类体外诊断试剂，应当以附录形式明确主要原材料以及生产工艺要求。

结核分枝杆菌复合群检测试剂已有国家参考品，技术要求中应体现国家参考品的相关要求，并使用国家参考品对三批产品进行检验。

如有适用的国家标准、行业标准，产品技术要求的相关要求应不低于相应的要求。

2. 分析性能研究

注册申请人应采用在符合质量管理体系的环境下生产的试剂盒进行所有分析性能研究，提交具体研究方法、试验方案、试验数据、统计分析等详细资料。

如申报产品适用不同的机型，需要提交采用不同机型进行性能评估的资料。如申报产品包含不同的包装规格，需要对各包装规格进行分析或验证。对于适用的不同样本类型应分别进行分析性能研究。

分析性能评估所用样本的基本信息均需明确，例如样本来源、样本类型、采集和处理方式、稀释方式、定值过程及数据等。研究中采用的结核分枝杆菌复合群样本，应采用科学合理的方法确定其阴阳性和浓度水平，提交具体的试验资料。如，结核分枝杆菌复合群阴性样本的确认，应结合临床诊断结果，采用涂片和培养鉴定的方式，并同时参考已上市的核酸检测试剂盒进行确认。结核分枝杆菌复合群阳性样本，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。分析性能评估用样本一般应为临床样本或菌株，如涉及稀释后检测，应采用与适用样本类型一致的阴性基质。如，将已知浓度的菌株与结核分枝杆菌复合群阴性痰样本进行混合，完全按照申报试剂的操作步骤对此制备进行样本前处理、核酸提取/纯化、扩增等。不可采用质粒进行分析性能评估。对于各项性能中采用的样本，在下述各项性能研究资料中分别提供样本信息列表。

2.1样本稳定性

对采集后各阶段的样本进行稳定性研究，包括采集后未经处理的样本、加入不同保存液或裂解液的样本、采用不同灭活方式处理后的样本，研究内容包括冷藏保存时间，冷冻保存时间，冻融次数等。

如产品适用痰、支气管肺泡灌洗液、胸腔积水等不同的样本类型，因其中干扰物质存在差异，可能对引起细菌DNA链断裂的影响不同，建议对每种样本类型均进行稳定性研究。用于样本稳定性研究的样本应包括略高于最低检测限浓度的样本。

如核酸提取液可不立即进行检测，还需对核酸提取液的保存条件和稳定性进行研究。

2.2 适用的样本类型

列明产品适用的样本类型，如痰样本、支气管肺泡灌洗液样本、胸腔积液样本，应分别进行分析性能评估。

2.3准确度

采用申报试剂与临床诊断或已上市产品，同时检测临床样本，比较检测结果之间的一致性程度，进行申报试剂的准确度评价。

样本应选择符合样本稳定性的预期人群样本。研究应纳入一定数量的阴性和阳性样本，并注意包含一定数量的阳性判断值附近的样本和干扰样本。

2.4企业参考品验证

根据主要原材料研究资料中的企业参考品设置情况，采用三批产品对企业参考品进行检验并提供详细的试验数据。

2.5精密度

应对精密度指标，如标准差或变异系数等的评价标准做出合理要求。应考虑运行、时间、操作者、仪器、试剂批次和地点等影响精密度的条件，设计合理的精密度试验方案进行评价。精密度评价试验应包含核酸提取步骤。设定合理的精密度评价周期，例如为期至少20天的检测，具体方案可参考性能评价相关文件进行。

采用结核分枝杆菌标准菌株（阴性样本不适用）作为样本进行精密度评价，应至少包含3个水平：阴性样本、临界阳性样本、中/强阳性样本，并根据产品特性设定适当的精密度要求，例如：

阴性样本：待测物浓度为零，即不含结核分枝杆菌的样本，阴性符合率应为100%（n≥20）。

临界阳性样本：待测物浓度略高于试剂盒的检出限，阳性符合率应≥95%（n≥20）。

中/强阳性样本：待测物浓度呈中度到强阳性，阳性检出率为100%且CV≤5%（n≥20）。

2.6检出限

2.6.1检出限的建立

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）梯度稀释于与适用样本一致的基质中，每个浓度梯度至少重复20次检测，通过直接检测或者Probit分析计算，将具有95%阳性检出率的菌株最低浓度水平作为确定的检出限。

2.6.2检出限的验证

另外选择具有时间和区域特征性的至少3株结核分枝杆菌菌株、牛结核分枝杆菌菌株或BCG菌株（如适用） 在检出限浓度水平进行至少20次的重复试验验证，应达到95%阳性检出率。

2.7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)、非洲结核分枝杆菌、羊结核分枝杆菌和田鼠结核分枝杆菌进行验证。应选择不同来源的多个菌株进行研究，并包括检出限和重复性的验证。应提供各个菌株的来源、菌株特性及浓度等信息，且应证明所有采用的菌株含有靶核酸序列。注意包容性研究菌株和检出限研究菌株不能重复。

2.8分析特异性

2.8.1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、呼吸道和胸腔共生的病原体等，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。通常，进行交叉反应验证的分枝杆菌、细菌或真菌感染的浓度水平为106CFU/mL或更高，病毒为105PFU/mL或更高。也可采用其他合理方法定值的浓度，例如核酸浓度107 copies/mL或更高。申请人应提供用于交叉反应验证的病原体的来源、制备方法、种属/型别信息和浓度确认等试验资料。

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 | 苏尔加分枝杆菌 |
| 海分枝杆菌 | 龟分枝杆菌 |
| 土分枝杆菌 | 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 | 铜绿假单胞菌 |
| 表皮葡萄球菌 | 白色念珠菌 |
| 隐球菌 | 烟曲霉 |
| 人流感病毒（A型和B型） | 人类副流感病毒（1、2和3型） |

注:表中所列病原体均应进行验证。

2.8.2干扰研究

2.8.2.1干扰试验

应根据所采集样本类型，针对可能存在的内源/外源物质干扰情况进行验证，验证推荐物质见表3。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，检测包含临界阳性水平在内的结核分枝杆菌复合群样本。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。对检测结果进行合理的统计分析，对比添加干扰物质前后的检测结果（如，Ct 值） 的差异。检测的潜在干扰物包括样本中的原有物质及在样本采集和处理期间引入的物质。

表3 用于干扰研究的物质

|  |  |
| --- | --- |
| 血液（人类） | 蛋白（如：黏蛋白、白蛋白） |
| 人细胞 |  |
| 氯法齐明 | 贝达喹啉 |
| 异烟肼 | 乙胺丁醇 |
| 利福平 | 吡嗪酰胺 |
| 卡那霉素 | 利奈唑胺 |
| 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） | 样本采集和处理期间引入的物质 |

注: 表中所列内源性干扰物质均应进行验证。外源性药物均应进行验证，括号内至少选做一种。

2.8.2.2竞争性干扰

申请人应结合产品适用的样本类型，充分考虑临床上容易与结核分枝杆菌复合群合并感染的病原体，在高浓度的情况下对低浓度（例如检出限浓度）结核分枝杆菌复合群核酸检测的影响，进行竞争性干扰研究。

2.9核酸提取/纯化性能

在进行核酸检测之前，建议有核酸提取/纯化步骤。该步骤的目的除最大量分离出目的DNA外，还应有相应的纯化作用，尽可能去除PCR抑制物。对配合使用的所有核酸提取试剂进行提取核酸纯度、浓度、提取效率的研究，并与已上市的核酸提取试剂进行平行比对。若产品适用两种或以上核酸提取试剂，则每一种核酸提取试剂均需配合检测试剂进行抗干扰、精密度和检出限的验证。

2.10反应体系

2.10.1样本采集和处理

2.10.1.1样本采集方式的选择

2.10.1.2样本采集时间点的选择：是否受病程、临床症状、用药情况等因素的影响。

2.10.1.3样本处理方式的选择：

应对样本前处理进行研究。痰样本应对痰消化方式及消化液成分、浓度、使用量进行研究。如产品适用两种或以上消化液，则每一种消化液均需配合提取试剂及检测试剂进行精密度和检出限的验证，以证明不同的样本前处理方法不会影响检测结果。

2.10.2核酸提取和反应体系

研究确定最佳核酸提取和反应体系，包括核酸提取用的样本体积、洗脱体积和PCR加样体积、各种酶浓度、引物/探针浓度、dNTP浓度、阳离子浓度及反应各阶段温度、时间、循环数等。建议在保证核酸提取质量的情况下尽量扩大总反应体系和加样量，以提高检测灵敏度。

提交不同适用机型基线和阈值循环数的确定资料。

不同适用机型的反应条件如果有差异应分别详述，并提交验证资料。

3. 稳定性研究

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。

4. 阳性判断值研究

阳性判断值一般为申报产品检测结核分枝杆菌复合群阳性的Ct值。阳性判断值研究用样本来源应具有多样性和代表性，考虑不同时间、地域、不同的感染阶段和生理状态等因素，尽量纳入较多弱阳性样本。在条件允许的情况下，建议覆盖结核分枝杆菌复合群不同变种进行阳性判断值研究。采用受试者工作特征（ROC）曲线分析建立检测靶基因的阳性判断值。如判定值存在灰区，应提供灰区的确认资料。

如果产品适用不同样本类型，需要对各样本类型进行阳性判断值的验证。

提交阳性判断值研究所用样本的背景信息列表，至少包括性别、年龄、临床诊断信息、样本来源机构、检测结果等信息。

提供内标检测结果范围的确定方法和研究资料。

5.其他资料

5.1主要原材料研究

该类产品的主要原材料包括引物、探针、酶、dNTPs、核酸分离/纯化组分（如有）、质控品、企业参考品等。应提供主要原材料的选择与来源、制备过程、质量控制标准等相关研究资料、质控品的定值试验资料等。如主要原材料为企业自制，应提供其详细制备过程；如主要原材料源于外购，应提供资料包括：选择该原材料的依据及对比筛选试验资料、生产商提供的质量标准、出厂检验报告，以及该原材料到货后的质量检验资料。生产商应固定，不得随意更换。

5.1.1引物和探针

应详述引物和探针的设计原则，提供引物、探针核酸序列、靶序列的基因位点及两者的对应情况。建议针对每种被测病原体设计两套或多套引物、探针以供筛选，通过序列比对和功能性试验等方式，对结核分枝杆菌复合群进行包容性和特异性（如交叉反应）的评价，其中序列比对包括与已公布结核分枝杆菌复合群序列的比对，及与易产生交叉反应的其他病原体的序列比对；功能性试验包括对不同来源、不同浓度的结核分枝杆菌复合群核酸阳性样本，和不同的近缘病原体的检测。通过筛选确定最佳的引物和探针组合。引物、探针的质量标准应至少包括序列准确性、纯度、浓度及功能性实验等。

5.1.2脱氧三磷酸核苷（dNTPs）

包括dATP、dUTP、dGTP、dCTP和dTTP，应提供对其纯度、浓度、功能性等的详细验证资料。

5.1.3酶

需要的酶主要包括DNA聚合酶、尿嘧啶DNA糖基化酶等，应分别对酶活性、功能性等进行评价和验证。

5.1.4质控品

试剂盒一般包含阴性质控品和阳性质控品。阳性质控品应包含试剂盒检测的靶序列，可采用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群灭活菌株或其他克隆菌株，靶核酸为RNA时可采用假病毒等制备，建议制备浓度为弱阳性。质控品需参与样本处理、核酸的平行提取和检测的全过程，以对整个提取和PCR扩增过程、试剂/设备、交叉污染等环节进行合理质量控制。提交试剂盒质控品有关原料选择、制备、定值过程、浓度范围等试验资料，对质控品的检测结果Ct值范围做出明确的要求。

5.1.5内标

内标，又称内对照，可对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制，应与靶核酸一同提取及扩增。申请人需对内标的引物、探针设计和相关反应体系的浓度做精确验证，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基因检测造成的抑制。明确内标的检测结果Ct值范围。建议科学设置内标，对待测样本的取样质量、试剂的反应体系进行监控。

5.1.6企业参考品制备

申请人应根据产品性能验证的实际情况自行设定企业内部参考品，包括阳性参考品、阴性参考品、检出限参考品、精密度参考品。应提交企业参考品的原料来源、选择、制备、阴阳性及浓度确认方法或试剂等相关验证资料。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）。

阳性参考品应着重考虑结核分枝杆菌复合群的代表菌株，包含不同浓度水平的目标核酸阳性样本至少5例。

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，建议包括正常临床样本、非结核分枝杆菌样本、其他呼吸道病原体样本等。

检出限参考品应包含95%阳性检出水平或略高于检出限的水平，如100%阳性检出水平。

精密度参考品应包括高、低两个浓度的样本，其中一个浓度应为检出限附近的浓度。

5.2生产工艺研究  
　　介绍产品的主要生产工艺，可用流程图结合文字的方式表述。提交主要生产工艺的确定及优化的研究资料。

（四）临床评价资料

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）备案的临床试验机构，按照有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、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. 临床试验入组人群

应选择具有结核症状/体征的疑似结核患者病例，并包括其他易混淆疾病的病例（最终临床诊断确定不是结核），不建议选择正常健康人群。

应采用临床原始样本进行临床试验，并且应以新鲜样本为主，如采用冻存样本应另行说明。

3. 对比试剂的选择

3.1对于“已有同品种批准上市”的申报产品

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，采用申报产品与对比试剂进行比较研究试验，证明申报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产品与培养鉴定方法的对比研究，每种样本类型不少于100例，涂片阴性和阳性各不少于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PNB、测序、质谱、或其他已上市的核酸或抗原等检测试剂盒方法。

3.2无同类产品上市的新结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂

应选择培养鉴定和核酸序列测定（测序）方法作为对比方法。

4. 临床试验的样本量

4.1对于与已上市同类产品或测序进行的比较研究，建议采用单组目标值法计算临床试验的阳性样本量和阴性样本量，其中阳性符合率和阴性符合率的P0应不低于90%。其中，涂片阴性的结核患者占所有结核患者的比例应不小于50%。

4.2对于新的结核核酸检测试剂，在与培养鉴定进行比较研究时，建议采用单组目标值法计算临床试验的阳性样本量和阴性样本量，其中阳性符合率的P0应不低于90%，阴性符合率P0值的确定应有充分的依据。

4.3如申报产品同时适用于多种样本类型，每种样本类型的样本例数应分别进行样本量估算。

4.4 如果申报产品针对某种样本类型有多种适用的样本前处理方法或核酸提取/纯化方法，如临床前性能研究显示多种方法之间存在差异，但不对临床性能造成显著影响，临床试验应进行不少于100例同源样本的对比试验，证明不同样本前处理方法或不同核酸提取/纯化方法不会影响检测结果，其中，阳性样本和阴性样本应各不少于50例；如不同方法几乎没有差异，且经临床前研究证明分析性能没有差异，则临床试验中不同样本类型可进行汇总统计。

5. 临床试验结果的要求

申报试剂对涂片阴性的结核患者应有一定的检出率；申报试剂对涂片阳性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%。

6. 测序方法的相关要求

6.1 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。

6.2测序方法原理、测序仪型号、测序试剂及关键消耗品的相关信息。

6.3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。用于核酸序列测定的引物序列应不同于申报产品中用于检测目的基因的引物序列。

6.4 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。

6.5 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。

6.6 提交有代表性的样本测序图谱及结果分析资料。

7.临床试验方法、临床数据及统计分析

7.1应在临床试验方案或者临床试验报告中明确申报试剂和对比试剂的检测方法和判定标准。

7.2在临床报告中，以列表的方式，明确：总样本例数、临床诊断为结核的患者总例数、涂片阴性的结核患者例数、涂片阳性的结核患者例数、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。

7.3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。

7.4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。

7.5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。

8.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，应采用临床参考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。复核结果不应纳入统计分析。如无需复核，应详细说明理由。

9.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。

10.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。

（五）产品说明书和标签样稿

产品说明书格式应满足《体外诊断试剂说明书编写指导原则》的要求。产品说明书中技术内容应与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，应以规范格式进行标注，并单独列明文献的相关信息。结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂说明书编写应重点关注以下内容。

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的病原学特征、流行病学特征、待测人群特征和现有诊断方法等。其中待测人群应选择具有结核症状/体征的疑似结核患者病例。

1.3强调本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。建议结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析

2. 【检验原理】

简述产品的核酸提取和技术原理，介绍检测靶基因名称、引物及探针设计/对照品（质控品）设置及荧光信号标记等。明确内标基因名称及其作用。如采用了防污染措施，对其作用机理进行简要描述。

3.【主要组成成分】

明确试剂盒中各组分及具体成分。明确需要但未提供的材料，例如核酸提取试剂等产品名称，生产厂家，货号及注册证号、备案号等信息。

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）、保存条件及有效期、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。明确提取后核酸的保存条件及有效期（如适用）。

6.【检验方法】详细说明实验操作的各个步骤，包括：

6.1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。

6.2试剂配制方法、注意事项。

6.3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）。

6.4扩增反应前准备：加样体积、顺序等。

6.5 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。

6.6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。

6.7基线、循环阈值（Ct值）的选择方法或相应的自动化检测程序。

7.【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。

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

8.2.1不合理的样本采集、转运、储存及处理、样本中细菌含量过低均有可能导致假阴性结果。

8.2.2该病原体待测靶序列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。

8.2.3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。

8.3有关假阳性结果的可能性分析

8.3.1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。

8.3.2 如果样本在运输、处理过程中发生交叉污染，则可能导致假阳性结果；

8.3.3 实验环境有PCR产物等气溶胶污染，则可能导致假阳性结果；

8.3.4 实验过程中使用的耗材、设备等受污染，则可能导致假阳性结果。

9【产品性能指标】详述以下性能指标：

9.1国家标准品（如适用）和企业参考品的符合率。

9.2检测限：简要介绍评价方法、所用样本情况以及评价结果。

9.3 对包容性的研究情况进行总结。包括结核分枝杆菌复合群信息，检出限和重复性性能的描述。

9.4精密度：对精密度的研究情况进行总结。

9.5分析特异性

9.5.1交叉反应：详述交叉反应验证的病原体名称、菌株特性，及有/无交叉反应的浓度水平。

9.5.2干扰物质：说明验证的干扰物质种类及有/无干扰反应的浓度水平。

9.6临床试验：简要介绍试验方法、受试者及样本、试验结果和结论等。

10【注意事项】

10.1本产品仅用于体外诊断。

10.2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》等有关分子生物学实验室要求。

10.3试剂保存运输及使用过程中多种因素可能导致性能变化，如保存运输不当、样本采集、样本处理及检测过程操作不规范等，请严格按照说明书操作。因样本采集过程及细菌感染过程本身的特点，可能存在采集到的样本量不足等原因带来的假阴性结果，应结合临床其他诊疗信息综合判断，必要时复测。

10.4生物安全防护相关内容。

10.5避免实验室污染的措施。