

# 碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测试剂 注册审查指导原则

本指导原则旨在指导注册申请人对碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> (*Klebsiella pneumoniae carbapenemases*, 肺炎克雷伯菌碳青霉烯酶) 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提供参考。

本指导原则是对碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测试剂的一般要求, 注册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。

本指导原则是供注册申请人和技术审评人员使用的指导性文件, 但不包括审评审批所涉及的行政事项, 亦不作为法规强制执行, 应在遵循相关法规的前提下使用本指导原则。如果有能够满足相关法规要求的其他方法, 也可以采用, 但是需要提供详细的研究和验证资料。

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, 随着法规和标准的不断完善, 以及科学技术的不断发展, 相关内容也将适时进行调整。

## 一、适用范围

本指导原则适用于基于实时荧光 PCR 法等分子生物学技术, 对人体痰液、直肠拭子、分离菌落样本中的碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 进行体外定性检测的试剂。

对于采用其他方法学、其他样本类型的碳青霉烯类抗生素

25 耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测试剂及其他碳青霉烯耐药基因检测试剂，  
26 可能部分要求不完全适用或本文所述内容不够全面，注册申请  
27 人应参照本指导原则，根据产品特性对适用部分进行评价，并  
28 补充其他评价。对于其他碳青霉烯类抗生素耐药基因检测试剂，  
29 可依据相关基因的具体特点参照执行。

30 本指导原则适用于碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测  
31 试剂进行产品注册和变更注册的情形。本指导原则针对注册申  
32 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  
33 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》  
34 等相关法规要求，同时建议参考《定性检测试剂分析性能  
35 评估注册审查指导原则》等适用的技术文件要求。

## 36 二、注册审查要点

### 37 （一）监管信息

#### 38 1. 产品名称

39 产品名称应符合《体外诊断试剂注册与备案管理办法》及  
40 相关法规的要求，如碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测试  
41 剂盒（荧光 PCR 法）。

#### 42 2. 分类编码

43 按照《6840 体外诊断试剂分类子目录》《体外诊断试剂分  
44 类规则》，该产品按照第三类体外诊断试剂管理，分类编码为  
45 6840-01-01148。

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

### 48 （二）综述资料

49 综述资料主要包括概述、产品描述、有关生物安全性的说

明、预期用途、申报产品上市历史及其他需说明的内容。

其中，需注意以下内容：

1.预期用途明确所检测的样本类型、靶基因、临床意义。

2.产品描述应明确申报产品所检测基因的选择依据、基因靶序列的选择依据，产品所有可检出的 *bla*<sub>KPC</sub> 亚型、尚未验证的 *bla*<sub>KPC</sub> 亚型以及各基因亚型的选择依据（如临床意义、流行特征）。产品设计时建议根据相关共识、文献进行综合考虑，尽量包含已发布的主要基因亚型。

明确检测耐药基因的临床意义、所检测的耐药基因与相应抗生素的相关性、基因型与表型耐药的符合率、抗生素用药背景及中国人群数据等。

3.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。

4.与已上市同类产品进行比较，比较内容包括预期用途、适用人群、样本类型、检测原理、检测靶标、组成成分、内标、质控品、判读规则、分析性能和临床性能等。应着重从检测靶标、所检菌株覆盖情况、基因亚型覆盖情况、检出限等方面详细说明申报产品与目前市场上已获批同类产品之间的主要区别。

### （三）非临床资料

1.产品技术要求及检验报告

#### 1.1 产品技术要求

注册申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下，

75 根据产品研制、前期评价等结果，依据国家标准、行业标准及  
76 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  
77 写指导原则》的要求编写。该产品作为第三类体外诊断试剂，  
78 应当以附录形式明确主要原材料以及生产工艺要求。

79 碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测试剂已有国家标准  
80 品，技术要求中应体现国家标准品的相关要求。

81 如有适用的国家标准、行业标准，产品技术要求的相关要  
82 求应不低于相应的要求。

## 83 1.2 检验报告

84 碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 检测试剂已有国家标准  
85 品，应使用国家标准品进行检验。

86 第三类体外诊断试剂应当提供三个不同生产批次产品的检  
87 验报告。

88 提交资料应符合《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》  
89 《医疗器械注册自检管理规定》等相关文件的要求。

## 90 2.分析性能研究

91 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  
92 剂进行所有分析性能研究，提交具体研究方法、试验方案、可  
93 接受标准、试验数据、统计分析等详细资料。提交分析性能研  
94 究的背景信息，包括试验地点、采用的试剂名称、规格和批号，  
95 仪器名称和型号，样本相关信息等。样本相关信息包括样本来  
96 源、样本类型、采集和处理方式、稀释方式、定值过程及定值  
97 结果、菌株编号及其 *bla*<sub>KPC</sub> 亚型相关信息等。

98 针对研究中采用的碳青霉烯类抗生素 *bla*<sub>KPC</sub> 耐药基因样本，  
99 应采用科学合理的方法（如 Sanger 测序、已上市同类产品检测

等）进行阴阳性的确认，采用科学合理的方法（如数字 PCR、标准曲线法（通过标准物质或构建质粒绘制标准曲线）等）进行样本浓度的确认。

分析性能评估用样本可采用灭活临床样本、灭活培养菌株加至阴性临床样本基质，应采用合理方法进行阴性基质的确认。此处阴性基质是指不含 *bla*<sub>KPC</sub> 基因的临床样本。不建议采用质粒等进行分析性能评估。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进行稀释。

对于分离菌落，应按照产品说明书要求进行样本的采集、处理及检测。

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。

如申报产品适用不同的样本类型，需要分别进行分析性能研究。

## 2.1 样本稳定性

应对样本稳定性进行研究，包括不同的样本采集处理方法，采集后未经处理的样本，加入不同裂解液/消化液/保存液进行处理的样本（如适用），研究内容包括室温保存、冷藏和冷冻保存条件及时间（如适用）。适于冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

如产品适用不同的样本类型，应对每种样本类型进行稳定性研究。

如核酸提取液可不立即进行检测，还需对核酸提取液的保

存条件和保存时间进行研究。

## 2.2 适用的样本类型

列明产品适用的样本类型。

## 2.3 准确度

### 2.3.1 方法学比对

采用申报试剂与诊断准确度标准或已上市核酸检测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。所选对比试剂的检测靶基因应与申报试剂一致，方法性能可比，且临床公认质量较好。对于无已上市核酸检测试剂的靶基因，可与 **Sanger** 测序进行比对。用于核酸序列测定的引物序列应不同于申报试剂中用于检测靶基因的引物序列。研究应纳入一定数量的阴性和阳性样本，纳入检测范围内的国内常见基因亚型（至少包含 *bla*<sub>KPC-2</sub> 及 1 种其他亚型），并注意包含一定数量阳性判断值附近的样本和干扰样本。

### 2.3.2 阴阳性参考品符合率

根据主要原材料研究资料中的企业参考品设置情况，采用至少三批产品对企业阴阳性参考品进行检测并提供详细的试验数据。

## 2.4 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纯化步骤。设定合理的精密度评价周期，例如为期至少 20 天的检测。对检测数据进行统计分析，获得重复性、中间精密度、再现性等结果。

应针对检测范围内的所有常见亚型（至少包含 *bla*<sub>KPC-2</sub> 及 1 种其他亚型）进行精密度研究。

可采用灭活临床样本、灭活培养菌株加至阴性临床样本基质进行精密度评价，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：不含 *bla*<sub>KPC</sub> 的样本，其检测为阴性的比率应为 100%（ $n \geq 20$ ）。

临界阳性样本：*bla*<sub>KPC</sub> 浓度略高于试剂的检出限，阳性检出率应高于 95%（ $n \geq 20$ ）。

中/强阳性样本：*bla*<sub>KPC</sub> 浓度呈中度至强阳性，阳性检出率为 100%且  $CV \leq 5\%$ （ $n \geq 20$ ）。

## 2.5 检出限

使用临床样本或临床分离菌株/标准菌株，采用与适用样本类型一致的阴性基质进行系列稀释，进行检出限建立与验证研究。

如样本类型为痰液，建议使用模拟基质进行稀释，如可使用含生理盐水、黏蛋白及人类基因组 DNA 的基质作为痰液样本替代基质。如样本类型为直肠拭子，建议使用阴性样本拭子采集液作为阴性基质。如样本类型为分离菌落，建议使用标准方法进行菌株的混悬、稀释和定值。无论使用何种模拟或替代基质，应进行基质比对性试验证明替代基质与临床实际样本的等效性。

应明确每份样本/菌株的来源、阴阳性及确认方式、浓度及确认方式、制备方法等信息。可采用数字 PCR、标准曲线等方

法进行样本/菌株核酸浓度的确认，以 copies/mL 为检测单位，若以 CFU/mL 作为菌浓度单位，提供 CFU/mL 和 copies/mL 的换算关系。

所选样本/菌株应纳入检测范围内的国内常见基因亚型（至少包含 *bla*<sub>KPC-2</sub> 及 1 种其他亚型）。

### 2.5.1 检出限的建立

采用不同来源的至少 5 个 *bla*<sub>KPC</sub> 阳性样本，稀释至多个浓度梯度进行检测，每个浓度至少重复 20 次检测，将具有 95% 阳性检出率的最低浓度水平作为确定的检出限。

### 2.5.2 检出限的验证

选择另外 5 个不同来源的 *bla*<sub>KPC</sub> 阳性样本，在检出限浓度水平进行验证，每个浓度至少重复 20 次检测，应达到 95% 阳性检出率。

## 2.6 包容性

包容性研究包括检出限和重复性验证。包容性研究样本和检出限研究样本应相互独立，不可重复使用。

针对痰液样本及直肠拭子样本，选择具有区域特征性的不同来源的临床样本或培养菌株进行研究。建议检索近年国内相关文献报道并收集各地区来源的不同菌株，研究应包含可检出的常见肠杆菌目耐药微生物（如肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌、肠杆菌属、沙门杆菌属），还应包含一部分鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌。

纳入检测范围内的国内常见基因亚型及已有明确报道且影响用药方案的 *bla*<sub>KPC</sub> 亚型的研究资料（至少包含 *bla*<sub>KPC-2</sub>、*bla*<sub>KPC-33</sub>、*bla*<sub>KPC-51</sub>、*bla*<sub>KPC-76</sub>、*bla*<sub>KPC-79</sub> 及其他亚型），分析假阴

性风险并在说明书局限性项下进行明确。建议使用临床样本或将培养菌株添加至阴性基质进行研究。

针对分离菌落样本，应提交来源于患者常见感染部位（如肺部感染、血流感染、泌尿道感染）的菌落研究资料。

## 2.7 分析特异性

### 2.7.1 交叉反应

对于检测范围外的其他碳青霉烯酶基因（如 A 类：IMI、SME、GES、NMC，B 类：NDM、IMP、VIM、GIM、SPM、SIM，D 类：OXA-23、OXA-24、OXA-48、OXA-58 和 OXA-51），建议通过生物信息学分析，如存在较高同源性，应采用人工合成样本进行交叉反应研究。

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的其它病原体，或待检测样本中可能共存的其它病原体。建议至少包括大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、流感嗜血杆菌、屎肠球菌、粪肠球菌、嗜麦芽窄食单胞菌、肺炎链球菌以及近 3 年内我国出现的主要临床耐药分离菌种，具体可参考中国细菌耐药监测网公布的信息。

申请人应提供所有用于交叉反应验证的微生物的来源、种属/型别和浓度确认等试验资料。建议在病毒和细菌感染的医学相关水平进行交叉反应的验证。通常，细菌感染的水平为  $10^6$  CFU/mL 或更高，病毒为  $10^5$  PFU/mL 或更高。

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】项中有所体现。

### 2.7.2 干扰试验

干扰试验通常包含内源性干扰（如异嗜性抗体、疾病相关蛋白、患者体内的异常生化代谢物）、外源性干扰（如样本添加剂、常用药物及其代谢物）等。

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。建议申请人在每种干扰物质的潜在最大浓度（“最差条件”）条件下进行试验，检测阴性样本及至少包含临界阳性水平的 *bla*<sub>KPC</sub> 阳性样本。应注明不同干扰物质对被检测物质无干扰的最高限值。用于干扰试验研究的物质具体见表 1。

表 1 用于干扰试验研究的物质

| 类别     | 具体物质                              |
|--------|-----------------------------------|
| 内源物质   | 痰液样本：血液、黏蛋白、人细胞                   |
|        | 直肠拭子样本：血红蛋白、胆红素、白细胞、血清蛋白、多糖、胆固醇   |
| 常见治疗药物 | 亚胺培南、美罗培南、多立培南、粘菌素、氨基糖苷类、替加环素、磷霉素 |

## 2.8 核酸提取/纯化性能

在进行靶核酸检测前，应有适当的核酸分离/纯化步骤。该步骤的目的除最大量分离出靶核酸外，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、提取效率的研究，并与质量较好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。如果配

套核酸提取试剂提取原理存在差异，还需同时进行检出限的建立研究。

## 2.9 反应体系

### 2.9.1 样本采集

详述样本的采集方式、样本采集量的选择，提供相关的研究资料。直肠拭子样本还应提供拭子头、拭子杆材质研究资料，并在说明书中明确。

### 2.9.2 样本处理

不同类型的样本应分别进行研究。痰液样本重点关注样本处理及消化过程（明确消化液原理），包括所用试剂及用量、液化条件、液化时间，应在说明书中明确。直肠拭子样本重点关注保存液或裂解液的成分、浓度、使用量的要求等，应在说明书中明确。分离菌落样本重点关注菌落培养、混悬液制备的要求等，应在说明书中明确。

### 2.9.3 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 反应加样体积、试剂用量、各种酶浓度、引物/探针浓度、dNTP 浓度、阳离子浓度及反应条件（各阶段温度、时间、循环数）、校准方法、质控方法等。

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. 稳定性研究资料

申报试剂的稳定性研究主要包括实时稳定性、运输稳定性、开瓶稳定性、机载稳定性及冻融次数限制（如适用）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。对于开瓶稳定性研究，应模拟真实使用情形，包括开瓶稳定性的开瓶频次和开瓶时间等。

#### 4.阳性判断值

对于此类试剂，阳性判断值主要是指用于结果判断的Ct值。申请人可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。如采用其他研究方法，应说明其合理性。

阳性判断值研究用样本来源应具有多样性和代表性，应为预期人群，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。提交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。

如果产品适用不同样本类型，应对各样本类型进行阳性判断值的验证。

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 主要原材料研究资料

该类产品的原材料包括引物、探针、dNTP、酶、核酸分离/纯化组分（如有）、质控品、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、质控品的定值研究资料等。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，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 KPC 基因亚型序列、已公布其他耐药基因位点序列、易产生交叉反应的其他序列的比对。

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（dNTP）

包括 dATP、dUTP、dGTP、dCTP、dTTP，应提供对纯度、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 聚合酶等，应分别对酶活性、功能性等进行评价和验证。

#### 5.1.4 核酸分离/纯化组分（如有）

应提交核酸分离/纯化组分主要组成、原理介绍及相关验证资料。

#### 5.1.5 质控品

319 此类试剂的质控品一般包括阳性质控品和阴性质控品，可  
320 采用灭活菌株、工程菌株、质粒等制备。阳性质控品应包含试  
321 剂所检测的靶序列，阴性质控品应不含试剂所检靶序列的基因，  
322 质控品的基质应与实际样本基质一致或接近。

323 质控品应参与样本核酸的平行提取，以对整个 PCR 反应过  
324 程、试剂/设备、交叉污染等环节进行合理质量控制。申请人应  
325 提交试剂质控品有关的原料选择、制备、定值过程、浓度范围  
326 等试验资料，对质控品检测结果 Ct 值范围或浓度范围做出明确  
327 要求。

#### 328 5.1.6 内标

329 应设置合理的内对照（内标）以对管内抑制可能造成的假  
330 阴性结果进行质控。

331 申请人应对内标的引物、探针和模板的浓度做精确验证，  
332 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  
333 基因检测造成的抑制。明确内标检测结果的 Ct 值范围。申请人  
334 应提交内对照（内标）基因的选择、制备、定值过程及试验资  
335 料。

#### 336 5.1.7 企业参考品

337 该类产品的企业参考品一般包括阳性参考品、阴性参考品、  
338 检出限参考品和精密度参考品。应根据产品性能验证的实际需  
339 要设置企业参考品。

340 应提交企业参考品的原料来源、选择、制备、阴阳性及浓  
341 度确认方法等相关验证资料。企业参考品可优先采用灭活菌株，  
342 难获得的可采用工程菌株等制备，参考品基质应与适用样本基  
343 质一致。企业参考品的设置建议如下：

阳性参考品：根据检测范围设置不同基因亚型（应涵盖我国常见亚型，至少包括 *bla*<sub>KPC-2</sub>），并覆盖不同浓度。阳性参考品的亚型以及浓度需经可靠方法进行确认。

阴性参考品：应包括不含 *bla*<sub>KPC</sub> 的阴性样本。建议纳入多个菌种。

检出限参考品：设置略高于检出限（如 100%阳性检出率）的水平。

精密度参考品：设置高、低两个浓度的样本，其中一个浓度应为检出限附近的浓度。如有必要，建议同时设置阴性浓度的参考品。

## 5.2 生产工艺研究资料

介绍产品主要生产工艺，可用流程图结合文字的方式表述并标明关键工艺质控步骤。提交主要生产工艺的确定及优化研究资料。

### （四）临床试验

临床试验的开展、方案的制定以及报告的撰写等均应符合相关法规及《体外诊断试剂临床试验技术指导原则》的要求，如相关法规、文件有更新，临床试验应符合更新后的要求。

#### 1. 临床试验机构的选择

应选择不少于 3 家（含 3 家）经备案的医疗器械临床试验机构，按照相关法规、指导原则的要求开展临床试验。临床试验机构的选择应尽量考虑拟申报产品的特点和预期用途，综合流行病学背景，鉴于不同地区及医疗机构中碳青霉烯类抗生素耐药菌流行情况的差异，应选择不同地区的临床试验机构开展临床试验。且临床试验机构应具有分子生物学方法检测的优势，

实验操作人员应有足够的时间熟悉检测系统的各环节，熟悉评价方案。

## 2. 临床试验设计

有已上市同类产品的，建议选择已上市同类产品作为对比试剂进行比较研究。对比试剂在预期用途、适用人群、样本类型、检测方法学、检测性能、检测基因靶序列以及覆盖基因型和突变型等方面应与试验体外诊断试剂具有较好的可比性。

针对新样本类型，则可选择与 **Sanger** 测序以及药敏试验进行比较研究。应注意，药敏试验应选择代表性碳青霉烯类抗生素，至少应包括美罗培南、亚胺培南及厄他培南。

针对不同样本类型对应的不同预期用途，应分别设计临床试验进行研究。

## 3. 病例选择及样本类型

临床试验病例选择应根据产品声称预期用途中使用的样本类型及适用人群进行选择，如临床背景内容中所述，该产品适用不同样本类型时对应不同的临床预期用途，采用直肠拭子样本的试剂用于碳青霉烯类抗生素耐药菌院内感染的预防和控制时，应采用医疗机构中的住院病人包括重症监护病人、器官移植、造血干细胞移植等病例进行临床研究；采用痰液用于结合其他实验室检测等辅助诊断碳青霉烯类抗生素耐药菌感染时，应采用疑似革兰氏阴性菌引起的院内获得性肺炎以及呼吸机相关肺炎等病例进行临床研究；采用分离菌落样本用于临床需进行培养检测的疑似碳青霉烯类抗生素耐药菌感染患者的辅助诊断时，应采用临床需进行微生物培养并进行碳青霉烯类抗生素耐药菌感染确认的患者作为病例进行临床研究。同时适用于上述不同样本

类型时，应分别进行相关病例的临床研究。

申请人在建立病例纳入标准时，应综合考虑到试剂所适用的各类人群的潜在差异，如年龄、性别、病情等。

临床试验中常见的肠杆菌目细菌均应有一定例数入组，还应入组一部分铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌等细菌感染病例。

针对分离菌落样本，应为来源于患者感染部位的菌落。

对于直肠拭子和痰液样本，与已上市同类产品比较时，应注意入组一部分弱阳性样本（一般将对比试剂检测的 Ct 值小于 cutoff 值 3~5 个 Ct 值的样本定义为弱阳性样本），弱阳性样本应覆盖每种样本类型。

#### 4. 临床试验病例数

与对比试剂或与 Sanger 测序的比较研究的临床试验样本量应满足统计学要求，可采用适当的统计学方法进行估算。临床试验可依据试验用体外诊断试剂相对于对比方法的阴阳性符合率分别估算最低阴阳性样本例数。

临床样本量的估算建议采用如下样本量公式计算，

$$n = \frac{\left[ Z_{1-\alpha/2} \sqrt{P_0(1-P_0)} + Z_{1-\beta} \sqrt{P_T(1-P_T)} \right]^2}{(P_T - P_0)^2}$$

公式中，n 为样本量； $Z_{1-\alpha/2}$ 、 $Z_{1-\beta}$  为显著性水平和把握度的标准正态分布的分数位， $P_0$  为评价指标的临床可接受标准， $P_T$  为试验体外诊断试剂评价指标预期值。其中，阴、阳性符合率的临床可接受标准（ $P_0$ ）建议不低于 90%。

临床试验总体样本量确定时应在上述阴、阳性样本最低样本量估算的基础上，同时考虑其他可能造成受试者脱落的情况

适当增加入组样本量。

因不同样本类型适用不同预期用途，因此针对每一种预期用途临床试验的病例数均应分别满足上述统计学要求。

针对药敏试验，建议不少于 300 例，应至少包括 150 例碳青霉烯类抗生素耐药菌和 150 例碳青霉烯类抗生素敏感菌。应以 *bla*<sub>KPC</sub> 为主要耐药机制的细菌为主，并具有一定的菌种代表性。

## 5. 统计学分析

首先应对入组人群的人口学进行分析，包括年龄、性别、临床诊断背景、纳入菌种等。临床试验中包含不同样本类型的，每个样本类型分别进行统计分析。

对临床试验结果的统计应选择合适的统计方法，如阳性符合率、阴性符合率、临床灵敏度、特异度等。常选择四格表的形式总结两种方法的定性检测结果，并计算试验体外诊断试剂与对比方法的阳性符合率/灵敏度、阴性符合率/特异度、总符合率及其相应的 95% 置信区间。

针对纳入的不同菌株，如肠杆菌目（肺炎克雷伯菌、大肠埃希菌等）、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌进行亚组分析。

临床试验中所有不一致结果均应结合其他方法的检测结果、患者的临床症状、疾病转归等信息进行充分的分析。

## 6. 临床试验方案

临床试验实施前，研究人员应从流行病学、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研究方案。各临床研究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

应在临床研究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病例纳入/排除标准，任何已经入选的病例再被剔除出临床研究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。

## 7.质量控制

临床试验开始前，建议进行临床试验的培训，以熟悉并掌握相关试验方法的操作、仪器、技术性能等，最大限度控制试验误差。整个试验过程都应处于有效的质量控制下，最大限度保证试验数据的准确性及可精密度精密度。

## 8.临床证据的形式要求

申请人应按照《体外诊断试剂注册与备案管理办法》《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》等法规文件要求提交各机构伦理审查意见、临床试验方案、临床试验小结、临床试验报告以及临床试验数据库。

临床试验数据表作为临床试验小结的附件提交。数据表中应包括唯一且可溯源的样本编号、年龄、性别、样本类型、样本来源（适用于分离菌落样本）、临床诊断背景信息、试验体外诊断试剂检测结果、对比试剂的检测结果等。

关于测序试验，申请人应提供关于测序部分的详细试验资料，包括测序方法的建立及验证资料，需由临床试验机构签章确认。

## （五）产品说明书和标签样稿

产品说明书格式应符合《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均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。

碳青霉烯类抗生素耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub> 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 试剂用于体外定性检测碳青霉烯耐药患者的痰液、直肠拭子、分离菌落样本中的耐药基因 *bla*<sub>KPC</sub>。

1.2 明确试剂不同样本类型的临床意义，如直肠拭子样本用于碳青霉烯抗生素耐药菌院内感染的预防和控制；痰液用于结合其他实验室检测等辅助诊断碳青霉烯抗生素耐药菌感染；分离菌落样本用于临床需进行培养检测的疑似碳青霉烯抗生素耐药菌感染患者的辅助诊断。

1.3 简要介绍靶基因特征，包括亚型情况的描述，所检测的耐药基因与相应药物的相关性。

1.4 强调该试剂检测结果仅供临床参考，不应作为治疗药物调整的唯一依据，临床医生应结合患者病情及其他实验室检测指标等因素对患者治疗进行综合判断。

## 2. 【检验原理】

详述核酸提取纯化及试剂检测原理，说明检测的耐药基因位点信息，明确内标名称。介绍引物及探针设计、不同样品反应体系（管）组合、对照品（质控品）设置及荧光信号标记等。如采用了防污染措施，应进行简要描述。

### 3. 【主要组成成分】

3.1 说明试剂盒所包含组分的名称、数量、装量等信息，如含有人源组分，应提供其生物学来源、活性及其他特性；说明不同批号试剂盒中各组分是否可以互换。

3.2 试剂中不包含但该项检测必需的组分，如样本保存液及其他配套使用的材料，应列出相关试剂/耗材的名称、注册证号或备案号（如有）及其他相关信息。

3.3 如果试剂盒中不包含用于核酸分离/纯化的试剂组分，则应在此注明经验证后推荐配合使用的商品化核酸分离/纯化试剂盒的注册人（备案人）、货号及其注册证编号（备案编号）等详细信息。

### 4. 【储存条件及有效期】

明确试剂的效期稳定性、开瓶稳定性、复溶稳定性（如适用）、冻融次数（如适用）要求，应标明具体的储存条件及效期。明确生产日期、使用期限/失效日期/有效期至见标签。

### 5. 【样本要求】

明确适用的样本类型，详述样本采集、保存、运输和处理方式。

针对痰液样本，应包括采样步骤、采样量、消化液用量及消化时间等。

针对直肠拭子样本，应包括采样步骤、保存液用量、拭子头、拭子杆材质等。

针对分离菌落样本，应包括采样步骤、菌落培养、混悬液制备等。

如有临床公认推荐的采样要求，应遵循，并引用相应的技

术规范或指南。明确样本及核酸提取液（如适用）的保存稳定性。

## 6. 【适用机型】

注明所有适用的仪器型号。

## 7. 【检验方法】

7.1 试剂准备及配制方法、注意事项。

7.2 详述待测样本、对照品（质控品）的核酸提取/纯化条件（包括样本体积、洗脱体积）、步骤及注意事项。对照品（质控品）应与待测样本同步进行核酸提取。

7.3 扩增反应前准备：各组分加样体积、顺序等。

7.4 明确各适用机型的反应参数设置（包括 PCR 各阶段的温度、时间设置、循环设置及相关注意事项），基线、循环阈值（Ct 值）的选择方法，以及各检测靶标对应的荧光通道。

7.5 校准方法的描述。

7.6 实验的有效性判断：明确内标、质控品检测结果 Ct 值范围。

## 8. 【阳性判断值】

简要说明阳性判断值研究、统计方法及结论，明确基本信息，包括样本量、人群特征（如性别、年龄等）。

## 9. 【检验结果的解释】

以阳性判断值的研究结论为依据，结合阴、阳性质控品及内标检测结果，对所有可能出现的结果组合（如阴性、阳性、灰区/复测、无效等）及相应的解释进行详述。

## 10. 【检验方法局限性】

10.1 本试剂检测结果应结合患者临床症状及其他相关医学

检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据。

## 10.2 导致假阴性/假阳性结果的可能性分析：

10.2.1 不合理的样本采集、处理、运输及保存条件，样本中目标物浓度过低，可能导致假阴性。

10.2.2 待测目标基因序列的变异或其他原因导致的序列改变，可能导致假阴性。

10.2.3 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等，可能导致假阴性结果。

10.2.4 不当的实验操作和实验环境，可能导致假阴性或假阳性结果。

10.3 耐药基因型与表型可能存在一定程度的不一致性。本产品检测阴性不能排除存在其他耐药机制。

10.4 明确该试剂仅限于规定的样本类型及适用机型。

## 11. 【产品性能指标】

简述试剂性能指标和研究情况，包括试验方法和结果，建议包含参考品符合性、准确度、检出限、包容性、精密度、分析特异性、临床试验等。

## 12. 【注意事项】

应至少包括以下内容：

12.1 有关人源组分（如有）的警告，如：试剂盒内校准品、质控品或其他可能含有人源物质的组分，虽已通过乙型肝炎表面抗原（HbsAg）、人类免疫缺陷病毒抗体（抗-HIV1/2）、丙型肝炎抗体（抗-HCV）等项目的检测为阴性，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。提示对于潜在传染源的处理方式。

569 12.2 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规  
570 范》配备设备及操作人员，应严格按照说明书要求进行操作。

571 12.3 强调实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方  
572 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  
573 合理的生物安全防备设施及防护程序。

### 574 三、参考文献

575 [1] 国家药品监督管理局. 关于公布体外诊断试剂注册申  
576 报资料要求和批准证明文件格式的公告: 国家药品监督管理局  
577 公告 2021 年第 122 号[Z].

578 [2] 国家食品药品监督管理总局. 体外诊断试剂说明书编写  
579 指导原则: 国家食品药品监督管理总局公告 2014 年第 17 号[Z].

580 [3] 国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心. 定性检测  
581 试剂分析性能评估注册审查指导原则: 国家药品监督管理局医  
582 疗器械技术审评中心公告 2022 年第 36 号[Z].