附件3

基于核酸检测方法的金黄色葡萄球菌和耐甲氧西林金黄色葡萄球菌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基于核酸检测方法进行耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌鉴别检测的体外诊断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。

本指导原则是针对基于核酸检测方法进行耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌鉴别检测的体外诊断试剂的一般要求，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性文件，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、适用范围

（一）临床背景

金黄色葡萄球菌（Staphylococcus aureus，SA）为革兰阳性球菌，是葡萄球菌属的一种，分布广泛，多种动物和人均有易感性，是临床上常见的致病菌。随着抗菌药物的使用，逐渐出现耐药型金黄色葡萄球菌，如耐甲氧西林金黄色葡萄球菌（Methicillin-resistant staphylococcus aureus,MRSA）。MRSA具有多重耐药性，不仅对β-内酰胺类抗菌药物耐药，也对氨基糖苷类、大环内酯类、四环素类和喹诺酮类药物都表现出不同程度的耐药，其对不同抗菌药物的耐药率存在较大的地域差异，并有不同的变化趋势。

MRSA分为医疗机构相关性MRSA（healthcare-associated MRSA，HA-MRSA)、社区相关性MRSA ( community-associated MRSA，CA-MRSA )和家畜相关性（Livestock- associated MRSA，LA-MRSA）。CA-MRSA 和HA-MRSA 、LA-MRSA在微生物学、细菌耐药（如HA-MRSA相较于CA-MRSA表现出更多多重耐药）及临床特点方面（如感染部位）有较大差异，根据这些特点可以将两者进行区分。但由于人员在医院和社区间不断流动，CA-MRSA 和HA-MRSA 的差异日渐缩小。MRSA的分型有多种方式，如SCCmec、*spa*基因分型、多位点序列分型（MLST）、基于脉冲场凝胶电泳（PFGE）的分型等。

MRSA的耐药机制可能是由于MRSA受到外界刺激后本身固有耐药基因被激活或是引入了外来的耐药基因并激活。目前临床分离的MRSA菌株对大多数β-内酰胺抗菌药物耐药（新型头孢菌素类除外），大部分耐药是由mecA、mecC基因介导，但是小部分MRSA不携带mecA基因，存在其它耐药机制。

目前SA的临床检测方法包括：分离培养后，经染色观察、血浆凝固酶试验、生化鉴定，质谱鉴定及聚合酶链反应（PCR）检测耐热核酸酶（nuc）基因、SA保守基因16S rRNA和SA多种毒素基因。

MRSA的检测方法包括头孢西丁纸片扩散法、苯唑西林微量肉汤/琼脂稀释法（MIC）、苯唑西林琼脂筛选法、青霉素结合蛋白（PBP2a）乳胶凝集法、显色培养基法、自动化药敏检测以及聚合酶链反应（PCR）检测mecA等基因方法。

美国临床和实验室标准协会（CLSI）推荐用于MRSA的检测方法有：纸片扩散法、2%NaCl肉汤/琼脂稀释法和苯唑西林琼脂筛选法，这些检测方法均需要在33-35℃条件下孵育24小时。

目前临床推荐选择头孢西丁筛查试验进行MRSA的检测，还可以选择苯唑西林微量肉汤/琼脂稀释法（MIC）。

MRSA/SA的临床检测样本类型包括但不限于鼻拭子、痰液、皮肤及软组织感染样本、血培养阳性并革兰染色法阳性球菌的样品等人体样本和培养物。不同样本类型可能适用于不同的临床预期用途：如用于医疗机构对住院病人包括重症监护病人、手术病人及长期护理病人等MRSA院内感染的预防和控制的监测，用于结合其他实验室检测如微生物培养等辅助诊断MRSA/SA的感染，用于临床需进行培养检测的患者MRSA/SA感染的辅助诊断等。

（二）本指导原则适用范围

本指导原则适用于基于核酸检测方法进行耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌鉴别检测的体外诊断试剂。常见方法包括荧光聚合酶链反应（PCR）方法、基因芯片法等。本指导原则的相关内容基于荧光聚合酶链反应（PCR）方法对产品相关申报资料提出要求，其他方法的相关产品可依据方法学的具体特点参照执行。

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、有关产品主要研究结果的总结和评价以及其他内容，其中，与预期用途相关的临床适应症应重点描述申报产品所检测的金黄色葡萄球菌鉴定基因的选择依据、耐药突变位点与耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的相关性、基因选择的依据及覆盖的耐药菌的情况、产品验证覆盖的耐药菌株及其在我国的流行特征；产品描述应明确申报产品所有可检出的耐药基因型（可包含不同分型方式下的分型，如SCCmec型、*spa*型以及PFGE分型）、尚未验证的耐药菌株型别；同类产品在国内外批准上市的情况，应着重从所检菌株覆盖情况、检测的最低检出限及不同菌株和型别间的交叉反应等方面写明拟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。综述资料的撰写应符合《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）和《体外诊断试剂注册申报资料要求及说明》（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）主要原材料研究资料

此类产品主要为PCR方法，主要原材料包括引物、探针、DNA聚合酶、dNTP、尿嘧啶糖基化酶（如有）、核酸分离/纯化组分（如有）、试剂盒质控品及企业参考品等。应提供主要原材料的选择与来源、制备及质量标准等的研究资料、质控品的确认试验资料；生产企业还应提供企业参考品的原材料选择、来源、质量指标、参考品的制备及阴阳性的确认过程等。

1.引物和探针：包括申报产品检测靶序列的引物和探针以及内对照的引物和探针。应详述引物和探针的设计原则，提供引物、探针核酸序列、模板核酸序列及两者的对应情况。针对检测靶序列的引物和探针，建议设计两套或多套引物、探针以供筛选，针对预期适用的型别进行检出准确性和特异性（如交叉反应）的评价，可采用扩增靶序列与SA和MRSA基因组比对研究的方法，最终确认最佳组合，并提交筛选的研究数据。引物、探针的质量标准应至少包括序列准确性、纯度检查、浓度检查及功能性实验等。

2.酶：需要的酶主要包括DNA聚合酶，其质量标准如下：

2.1DNA聚合酶应包括DNA聚合酶活性、无核酸内切酶活性、热启动能力（如适用）、热稳定性等。

2.2如申报产品中包含尿嘧啶DNA糖基化酶，应对其酶活性及热稳定性等质量控制标准进行规定。

3.dNTP：质量标准应至少包括纯度检查及功能性实验等。

4.核酸分离/纯化组分（如有）的原理介绍、主要组成、主要原材料的质量控制标准及相关验证资料。

5.试剂盒质控品

试剂盒的质控体系通过设置各种试剂盒质控品来实现，针对阳性质控品和阴性质控品，申请人应明确质控品的来源、质量标准、质控品阴阳性的确认方法及相关验证资料。质控品应参与样本处理和检测的全过程，如核酸的平行提取等步骤。申报产品的质控体系应考虑以下几个方面：

5.1阳性质控品中应含有包含试剂盒所检靶序列的DNA，优先使用MRSA/SA分离灭活菌株，也可以采用工程菌株、克隆菌株等。企业应对质控品的检测结果做出明确的范围要求（如Ct值）。

5.2阴性质控品应不含试剂盒所检靶序列的基因，阴性质控的基质应与实际样本基质一致或接近，以对可能存在的交叉污染产生的假阳性结果进行质量控制。

5.3对照（内标）可以对管内抑制导致的假阴性结果进行质量控制，申请人应对内对照（内标）的引物、探针设计和模板浓度做精确验证，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。对内对照的检测结果亦应做出明确的范围要求（如Ct值）。

6.企业参考品：应详细说明有关企业参考品的原料选择、制备过程、提供阴阳性确认等试验资料。

企业参考品应充分考虑产品检测靶物质的各种基因型别和耐药菌株，考虑产品验证的性能需求进行设置。具体要求如下：

6.1阳性参考品

阳性参考品应采用经鉴定确认的多个临床流行分离菌株、含有菌株纯化的基因组DNA等，包含申报产品声称的应检出的MRSA/SA基因型。应覆盖我国主要的流行耐药菌株，可包含不同分型方式下的分型，如SCCmec型、*spa*型以及PFGE分型等。

6.2阴性参考品（特异性参考品）

阴性参考品应考虑检测MRSA和SA的特异性分别进行评价的要求，应纳入不在试剂盒检测范围内的其他葡萄球菌、革兰阳性菌菌株和其他病原体样品，特别是可能存在潜在竞争抑制的甲氧西林敏感凝固酶阴性葡萄球菌。

6.3检测限参考品

检测限参考品应分别针对MRSA和SA每个分析物靶基因和不同样本类型设定检测限附近连续稀释的参考品，应使用处于对数增长期的菌进行制备，明确每个参考品的活菌数，以CFU/mL表示。应明确CFU的确定方法。

6.4精密度参考品

精密度参考品应使用菌株针对每个检测目标物设定一组参考品，包括阴性、弱阳性（略高于临界值，预期重复检测95%阳性）、中等阳性（高于临界值，预期检测结果100%阳性）三个水平。

如产品适用于不同的样本类型，建议针对不同样本类型设定不同的参考品基质，应与实际样本类型基质一致或相似，模拟基质应经证实与天然基质无显著差异。

若主要原材料为企业自己生产，其生产工艺必须相对稳定，并提交主要原材料制备过程；如主要原材料购自其他供应商，则需针对供应商的选择提供评价数据，并提供供应商出具的质量标准、出厂检定报告，以及申请人对该原材料进行的质量检验资料。

（三）主要生产工艺及反应体系的研究资料

1.介绍产品主要生产工艺，可以图表方式表示，并说明主要生产工艺的确定依据。

2.反应原理介绍。

3.详述样本采集、样本处理方式的选择和设置，提供相关的研究资料。

4.确定最佳反应体系的研究资料，包括样本用量、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。

5.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。

6.如申报产品包含核酸分离/纯化试剂，应提交对核酸分离/纯化过程进行选择的研究资料。

（四）分析性能评估资料

申请人应提交产品研制阶段对试剂盒进行的所有性能评价的研究资料，对于每项分析性能的评价都应包括具体研究目的、试验方法、可接受标准、试验数据、统计方法等详细资料。有关分析性能验证的背景信息也应在申报资料中有所体现，包括实验地点、适用仪器、试剂规格、批号和临床样本来源等。

针对不同的样本类型如鼻拭子、痰液、皮肤和软组织感染拭子样本、血培养分离样本等，申请人应分别完成性能评估，包括阴阳性符合率、最低检测限、精密度评价、干扰验证等。

分析性能评价的试验方法可以参考相关的国外或国内有关体外诊断试剂性能评估的指导原则进行。各项性能评价应符合以下要求。

1.核酸分离/纯化性能（如适用）

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目的核酸外，还应有相应的纯化作用，尽可能去除PCR抑制物。无论检测试剂是否含有核酸分离/纯化的组分，企业都应结合检测试剂的特性，对配合使用的核酸分离/纯化试剂针对声称样本类型的提取效率、提取核酸纯度等做充分的验证，提供详细的验证资料。

2.最低检测限

申报产品最低检出限的性能评估资料应包含最低检出限的确定及验证过程。

应使用临床分离获得的特征良好的MRSA/SA分离菌株进行最低检测限研究。所选菌株建议包含来自不同地区的MRSA/SA，以涵盖金黄色葡萄球菌的遗传多样性，应覆盖不同分型方式下的不同分型，如SCCmec型、*spa*型、PFGE分型，涵盖我国不同地区临床常见型别。最低检测限的确定研究试验应使用上述选定的多种有代表性的MRSA/SA分离菌株进行连续稀释，以CFU/mL为检测单位，如引入DNA拷贝数作为单位，应确定两者之间的换算关系。稀释基质应根据产品声称的样本类型分别配合相应的基质。如样本类型为鼻拭子、痰液或皮肤及软组织感染拭子，建议使用阴性鼻拭子或阴性皮肤及软组织拭子洗液或模拟基质进行稀释，如可使用含生理盐水、粘蛋白及人类基因组DNA的基质作为鼻拭子、痰液样本替代基质，使用含白细胞、红细胞、血浆的基质作为皮肤及软组织拭子样本的替代基质；如样本类型为经血培养并确定含革兰阳性球菌（GPC）的样本，应使用含人血液和适配的血液培养基作为模拟基质，并应添加高浓度的常见感染菌。可将模拟样本稀释液培养一段时间。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。

将各稀释液重复检测3-5次，预估检测限范围后制备至少20份检测限浓度样本，证实MRSA/SA检出率达到95%的浓度作为最低检测限。针对不同的血培养瓶或血培养系统，应分别验证检测限是否一致。

3.包容性

应通过实验证实产品能够检出的金黄色葡萄球菌中存在的基因多态性的MRSA/SA。在实验验证菌株纳入时考虑金黄色葡萄球菌的进化结构，常见克隆系和型别，并纳入不同SCCmec型、*spa*型、PFGE类型的菌株。建议检索近年国内相关文献报道并收集各地区、不同菌株（社区和医院内感染，鼻腔、皮肤和软组织感染等）进行菌株验证。被验证细菌的浓度应接近检测限水平，所有菌株应进行鉴定和浓度测定。并应在预期可能存在高浓度（高于106CFU/mL）的其他感染菌如甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（MSSA）和耐甲氧西林凝固酶阴性葡萄球菌情况下进行试验。

4．申请人应对申报产品精密度指标做出合理要求。精密度评价使用菌株配制的企业参考品或相应临床样本进行，且精密度评价试验应包含核酸分离/纯化步骤。针对本类产品的精密度评价主要包括以下要求。

4.1对可能影响检测精密度的主要变量进行验证，除检测试剂（包括核酸分离/纯化组分）本身的影响外，还应对分析仪、操作者、地点、检测批次等要素进行相关的验证。

4.2设定合理的精密度评价周期，例如：为期至少20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。

4.3用于精密度评价的参考品或临床样本均应至少包含3个水平：阴性、弱阳性（略高于临界值，预期重复检测95%阳性）、中等阳性（高于临界值，预期检测结果100%阳性），并根据产品特性设定适当的精密度要求，临床样本精密度评价中的每一次检测均应从核酸提取开始。

5.分析特异性

5.1交叉反应

交叉反应的验证应结合样本来源进行，针对不同样本类型考虑可能共生的潜在的交叉反应病原体。应使用高浓度交叉反应病原体（如高于106CFU/mL的细菌和酵母，高于105PFU/mL的病毒）进行交叉反应验证，以明确是否存在交叉反应所致的假阳性。

针对鼻拭子、痰液样本，应考虑在鼻中及呼吸道的致病菌和共生菌，如甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌（MSSA）、凝固酶阴性葡萄球菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌（MRSE），以及革兰阴性杆菌、革兰阴性球菌、奈瑟菌、莫拉菌、酵母菌、革兰阳性杆菌、革兰阳性球菌等临床常见菌种，凝固酶阳性葡萄球菌代表菌株。

针对皮肤和软组织感染样本或检测来自血培养测定为阳性微生物生长并经革兰染色证实为革兰阳性球菌的样本，应纳入更多微生物，包括皮肤菌群。对于血培瓶来源的样本无必要进行病毒交叉反应验证。

5.2微生物干扰

同样采用上述潜在交叉反应微生物，评价潜在微生物干扰，即是否对MRSA/SA临界水平样本检测产生干扰。建议采用存在于各标本类型的（鼻拭子、痰液、皮肤和软组织感染、血培养样本）和代表不同MRSA基因型的至少两个MRSA菌株在临界水平进行微生物干扰试验。

5.3干扰物质

评价各样本类型中可能存在的干扰物质是否对检测造成干扰。建议采用存在于各标本类型的（鼻拭子、痰液、皮肤和软组织感染、血培养样本）和代表不同MRSA基因型的至少两个MRSA菌株的临界浓度对干扰物质（潜在最高浓度）进行验证。鼻拭子样本的干扰物质应考虑血液、鼻腔分泌物或黏液、鼻腔用药。痰液样本的干扰物应考虑如血液、粘液、人细胞等。皮肤和软组织感染样本的潜在干扰物应考虑血液、脓液、血浆、常用外用抗菌药、抗生素等皮肤用药。血培养样本的潜在干扰物质应考虑血培养基、树脂及活性炭等，具体结合培养瓶类型确定。

6.阳性/阴性参考品符合率

阳性参考品的检测旨在验证试剂盒检测范围内的MRSA/SA均可以在适当的浓度被检测到，阳性参考品检测结果应为阳性。阴性参考品旨在评价试剂特异性，阴性参考品检测结果应为阴性。

7.方法学比对研究

为验证拟申报产品靶核酸检测的准确性，应选择部分临床样本将拟申报产品与已上市核酸检测试剂进行比较研究。所选对比试剂检测靶基因应与拟申报试剂一致，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目的基因，可与病毒核酸序列测定方法进行比对。用于核酸序列测定的引物序列应不同于考核试剂中用于检测目的基因的引物序列。建议对扩增子进行双向测序。方法学比对研究的具体方式可参考相关的国外或国内有关的指导文件进行，临床样本数量及其特性应具有代表性，能够充分验证拟申报产品靶核酸检测的准确性。

8.其他性能研究（如涉及）

如携带污染的验证，使用高阳性样本和阴性样本交叉检测多次运行，考察设备多样本检验是否存在携带污染。

（五）阳性判断值确定资料

对于此类试剂，阳性判断值即为针对每个目标物能够获得理想的临床灵敏度和临床特异性的临界值（Cutoff），对于荧光探针PCR方法即为Ct值的确定资料。建议采用受试者工作特征（ROC）曲线的方式进行相关研究。申请人应选取适当的足够数量的临床样本进行试验以确定阳性判断值。

（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）、开瓶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。

样本稳定性进行研究，可以在合理的温度范围内，每间隔一定的时间段即对储存样本进行全性能的分析验证，从而确认不同类型样本的效期稳定性。冷冻保存的样本还应对冻融次数进行评价。

对于样本提取后不能立即进行检测的，应明确核酸储存条件、储存时间等内容，同时应提供相应的核酸稳定性研究资料。

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）产品风险分析资料

申请人应参考YY/T 0316《医疗器械 风险管理对医疗器械的应用》规定的过程和方法，在产品生命周期内对申报产品可能造成的危害进行判定（可重点参考YY/T 0316的附录H），对每一危害处境的风险进行判定和评价，形成风险管理报告，控制这些风险并监视控制的有效性，充分保证产品的安全性和有效性。

该试剂的主要危害大致可包括三个方面，即：生物学和化学危害、操作危害、信息危害。

1.生物学和化学危害

生物学：如细菌、病毒引起的交叉感染、检测完成后剩余样本、试剂和废弃物处理不当引起的交叉感染。

化学：如使用的清洁剂、消毒剂残留引发的危害。

2.操作危害

不正确的测量：

如未按使用说明书中的要求进行测量，造成的测量失败、测量误差过大。

使用未经验证的不同厂家的分析仪或使用未经正确保养或校准的仪器，造成的测量失败、测量误差过大。

在制造商规定的使用环境条件外使用产品，可能造成测量误差过大。

3.信息危害

如说明书或标签缺少或不正确，标记的位置不正确，不能被正确的识别，不能清楚易认。

不符合法规及标准规定的产品说明书，包括产品说明书中未对限制充分告知，未对不正确的操作、与其他设备共同使用时易产生的危害进行警告，未正确标示储存条件、消毒方法、维护信息，未对因长期使用产生功能丧失而可能引发的危害进行警告，未对合理可预见的误用进行警告等引发的危害。

（八）临床评价资料

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》（国家食品药品监督管理总局通告2014年第16号）的要求。

1.研究方法

建议采用前瞻性临床试验对拟申报产品进行临床评价，以SA和MRSA鉴定和药敏检测临床参考方法作为对照方法，金黄色葡萄球菌鉴定应结合形态学、凝固酶试验和生化鉴定、质谱方法等方法，药敏方法建议使用头孢西丁纸片法或苯唑西林微量肉汤/琼脂稀释法（MIC），也可以应用相应的全自动鉴定药敏方法，证明拟上市产品的临床性能和预期用途。针对不同样本类型对应的不同预期用途，分别设计临床试验进行研究。

2.临床试验病例数

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。本临床试验的主要评价指标为拟申报产品相对于临床参考方法的灵敏度和特异性。

临床总体样本量应分别考虑SA和MRSA阳性和阴性样本量的统计需求，综合估算。SA和MRSA的临床试验阳性样本例数的估算建议采用单组目标值法，考核试剂的SA鉴定和MRSA药敏检测灵敏度目标值建议针对不同样本类型设置，建议鼻拭子、痰液、皮肤软组织拭子等直接样本的目标值不低于90%，血培养样本目标值不低于95%。通过参数估计（含相应可信区间估计）的方法证明产品针对SA鉴定和MRSA药敏检测的灵敏度不低于目标值，可参考如下样本量公式计算。

公式中，n为样本量；Z1-α/2、Z1-β为标准正态分布的分数位，P0为评价指标的目标值，PT为试验用体外诊断试剂评价指标预期值。

SA和MRSA的阴性样本量的估算可不采用目标值法，建议根据预实验获得的特异度的预期值采用如下公式计算：

公式中n为样本量，Z1-α/2为标准正态分布的分位数，P为评价指标预期值，Δ为P的允许误差大小，一般取P的95%可信区间宽度的一半，常用的取值为0.05-0.1。

同时总体样本确定时应考虑到培养鉴定的成功率、其他可能造成样本脱落的情况以及可能需要纳入的干扰等适当增加样本量。如不同样本类型适用不同预期用途，针对每一种预期用途临床试验总病例数均应分别满足统计学要求。

3.临床研究单位的选择

应选择不少于3家（含3家）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SA/MRSA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，不得选择同一地区地域相近的医疗机构进行临床试验。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。

4.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，采用鼻拭子样本的试剂用于MRSA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、手术病人及长期护理病人等病例进行临床研究；皮肤及软组织感染拭子用于结合其他实验室检测如微生物培养等辅助诊断MRSA/SA的皮肤和软组织感染时，应采用临床皮肤和软组织感染病例进行临床研究；血培养测定为阳性微生物生长并显示包含由革兰染色法产生的革阳性球菌（GPC）的样本用于临床需进行血培养检测的患者MRSA/SA感染的辅助诊断时，应采用临床需进行血培养检测的患者，且血培养测定为阳性微生物生长并显示包含由革兰染色法产生的革兰阳性球菌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。

同时应关注样本中其他病原体的存在情况、内源和外源干扰因素。

5.伦理学要求

临床试验必须符合赫尔辛基宣言的伦理学准则，必须获得临床试验机构伦理委员会的同意。研究者应考虑临床试验用样本的获得和试验结果对受试者的风险性，应提交伦理委员会的审查意见。

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排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。各研究单位选用的参比试剂应一致，以便进行合理的统计学分析。

7.统计学分析

对临床试验结果的统计应选择合适的统计方法，如检测结果一致性分析、临床灵敏度、特异度等。常选择2×2表的形式总结两种方法的定性检测结果。在临床研究方案中应明确统计检验假设，即评价考核试剂与参比方法是否等效的标准。灵敏度结果的95%置信区间下限应高于目标值。特异性结果与预期值差异应有明确可接受标准，如差异较大，应有合理的解释或继续扩大样本量。应分别对SA和MRSA的检测结果进行比较统计和分析。

对于不一致样本，应在方案中明确是否需进一步复测或确认，并对不一致原因进行分析。

8.质量控制

临床试验开始前，建议进行临床试验的预试验，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。

9.临床试验总结报告撰写

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。建议在临床总结报告中对以下内容进行详述。

9.1临床试验总体设计及方案描述

9.1.1临床试验的整体管理情况、临床研究单位选择、临床主要研究人员简介等基本情况介绍。

9.1.2病例纳入/排除标准、不同年龄段人群的预期选择例数及标准、盲态检测要求等。

9.1.3样本类型，样本的收集、处理及保存等。

9.1.4统计学方法、统计软件、评价统计结果的标准。

9.2 具体的临床试验情况

9.2.1临床试验所用体外诊断试剂及仪器的名称、批号、机型等信息。

9.2.2对各研究单位的病例数、年龄分布情况分布情况进行综合，建议以列表或图示方式列出各年龄组的样本例数。

9.2.3质量控制，试验人员培训、仪器日常维护、仪器校准、质控品运行情况。

9.2.4具体试验过程，样本收集、样本保存、样本检测、结果处理、结果不一致样本的确认等。

9.3统计学分析

9.3.1数据预处理、差异数据的重新检测或第三方验证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；

9.3.2结果的一致性分析

计算阳性符合率、阴性符合率、总体符合率，采用适当的统计学方法，如四格表卡方检验或kappa检验以验证两种试剂定性结果的一致性。

9.4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，对本次临床研究有无特别说明，最后得出临床试验结论。

9.5其他

临床试验中如涉及核酸序列测定方法，应在临床研究报告中对选用的测序方法做详细介绍，并提供以下关于测序试验的详细信息及资料。

9.5.1测序方法原理、测序仪型号、测序试剂及消耗品的相关信息。

9.5.2测序方法所用引物相关信息，如基因区段选择，分子量、纯度、功能性试验等资料。

9.5.3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拟申报产品的相关性能进行适当比对分析。

9.5.4测序方法应建立合理的阳性质控品和阴性质控品对临床样本的检测结果进行质量控制。

9.5.5提交有代表性的样本测序图谱及结果分析资料。

（九）产品技术要求

申请人应当在原材料质量和生产工艺稳定的前提下，根据申请人产品研制、前期临床评价等结果，依据国家标准、行业标准及有关文献，按照《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）的有关要求，编写产品技术要求。

该试剂的产品性能指标应主要包括：物理性状、阴/阳性参考品符合率、精密度、最低检测限等。性能指标应依据分析性能评估试验结果确定，检验方法应明确具体操作方法和使用的样本及参考品情况。

该产品为第三类体外诊断试剂，申请人应按照《医疗器械产品技术要求编写指导原则》的要求，以附录形式明确主要原材料、生产工艺及半成品要求，附录的编制应符合相关编写规范的要求。

（十）产品检验报告

应提供该产品符合产品技术要求的，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的产品检验报告；应提供连续3个生产批次样品的检验合格报告。

（十一）产品说明书

说明书承载了产品预期用途、标本采集及处理、检验方法、检验结果解释以及注意事项等重要信息，是指导实验室工作人员正确操作、临床医生针对检验结果给出合理医学解释的重要依据，因此，产品说明书是体外诊断试剂注册申报最重要的文件之一。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，进口体外诊断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的一致性，翻译力求准确且符合中文表达习惯。产品说明书中相关技术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，下面对耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌鉴别和检测的体外诊断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完成说明书编制。

1.【预期用途】

1.1试剂盒用于定性检测人鼻拭子、痰液、皮肤及软组织感染拭子、血培养测定为阳性微生物生长并显示包含由革兰染色法产生的革兰阳性球菌的样品等样本的耐甲氧西林金黄色葡萄球菌和金黄色葡萄球菌，适用样本类型应结合实际的临床研究完成情况进行确认。

1.2明确试剂不同样本类型的临床意义，如鼻拭子样本用于医疗机构对住院病人包括重症监护病人、手术病人及长期护理病人等MRSA院内感染的预防和控制；皮肤及软组织感染拭子用于结合其他实验室检测如微生物培养等辅助诊断MRSA/SA的皮肤和软组织感染；血培养测定为阳性微生物生长并显示包含由革兰染色法产生的革兰阳性球菌的样本用于临床需进行血培养检测的患者MRSA/SA感染的辅助诊断等。

1.3SA和MRSA流行特征介绍。

1.4简单介绍待测目标的特征，如待测靶基因特征及与SA和MRSA的关系等。

2.【检验原理】

详细说明试剂盒技术原理，即核酸分离/纯化方法、原理。说明检测的靶基因座位、序列长度等；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。如添加了相关的防污染组分（如尿嘧啶DNA糖基化酶，即UDG/UNG等），也应对其作用机理作适当介绍。

3.【主要组成成分】

详细说明试剂盒内各组分的名称、数量、成分、浓度等信息，如含有生物源性物质，应说明其生物学来源、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。

试剂盒中不包含但对该项检测必须的组分，应列出相关试剂的生产企业、产品名称、货号以及医疗器械注册证号/备案号（如有）等详细信息。当试剂盒中不包含用于核酸分离/纯化的试剂组分时，应在此注明经验证后推荐配合使用的商品化核酸分离/纯化试剂盒的如上信息。

4.【储存条件及有效期】

试剂盒的效期稳定性、开瓶稳定性、复溶稳定性、冻融次数要求等，应与相应的稳定性研究结论一致。

5.【适用仪器】

所有适用的仪器型号，提供与仪器有关的重要信息以指导用户操作。

6.【样本要求】

明确适用的样本类型。并详细描述样本采集及预处理要求、运输要求、保存条件及期限等。特别是样本采集所需设备及保存液，需特别明确供应商、货号及注册证号（如有）。有关描述均应建立在相关性能评价及稳定性研究的基础上。

样本的取材及处理方式等若有通用的技术规范或指南，则应遵循，并在此处引用。

7.【检验方法】

详细说明实验操作的各个步骤，包括：

7.1试剂配制方法、注意事项。

7.2核酸分离/纯化的条件、步骤及注意事项。对照品（质控品）参与样本核酸的平行提取的要求等。

7.3扩增反应前准备：各组分加样体积、顺序、相关注意事项等。

7.4 PCR各阶段的温度、时间设置、循环数设置及相关注意事项。

7.5仪器设置：特殊参数，待测基因、内标的荧光通道选择等。

7.6质量控制：说明对照品（质控品）的检测要求。

8.【阳性判断值】

简要总结阳性判断值研究方法及结论。明确说明样本的阳性判断值。

9.【检验结果的解释】

说明对照品、内标的正确结果要求，结合对照品（质控品）以及样本管中靶基因和内标的检测结果，对所有可能出现的结果组合及相应的解释进行详述。检验结果的解释应以阳性判断值的研究结论为依据。

10.【检验方法的局限性】

应至少包括如下描述：

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基因检测结果仅能覆盖耐药机制为相应基因（如mecA基因和或mecC）的耐药结果，但是小部分MRSA不携带mecA和/或mecC基因，存在其它耐药机制，可能出现漏检。

10.3不合理的样本采集、转运及处理以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。

11.【产品性能指标】

详述分析性能评估的试验结果并简要描述临床试验的基本信息、试验方法和结论。

12.【注意事项】

应至少包括以下内容：

12.1如该产品含有人源或动物源性物质，应给出生物安全性的警告。

12.2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。

12.3强调产品性能仅针对声称的适用样本类型及【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法（包括样本采集液等）进行了验证，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。

12.4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，实验室应具备合理的生物安全防备设施及防护程序。

四、编写单位

国家药品监督管理局医疗器械技术审评中心。