

结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂临床试验研究要点解析

刘容枝 李耀华

【摘要】 结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂具有提高痰涂片阴性肺结核的检出率及肺结核诊断的特异度的优点,并可相对快速地鉴别结核分枝杆菌复合群与非结核分枝杆菌。结核分枝杆菌复合群核酸检测试剂在临床试验中应注意临床试验机构、对比试剂、样本等的选择,以及样本前处理方法和核酸提取方法的临床验证等问题。作者将主要对该类试剂在临床试验中的上述重点问题进行阐述。

【关键词】 分枝杆菌; 结核; 核酸类; 临床试验; 试剂盒; 诊断

Analysis of key points of clinical trail using nucleic acid reagent of *Mycobacterium tuberculosis* complex LIU Rong-zhi, LI Yao-hua. Center For Medical Device Evaluation, China Food and Drug Administration, Beijing 100044, China

Corresponding author: LI Yao-hua, Email: liyh@cmde.org.cn

【Abstract】 Nucleic acid reagent of *Mycobacterium tuberculosis* complex could increase the detection rate of smear-negative pulmonary tuberculosis and the specificity of pulmonary tuberculosis diagnosis, and identify *Mycobacterium tuberculosis* complex and non-tuberculous mycobacteria more rapidly. When this reagent used in clinical trials, the choose of clinical trial institution, sample and contrast reagents, etc., and clinical verification of sample processing and nucleic acid extraction method should be concerned. The above key issues would be analyzed in this paper.

【Key words】 *Mycobacterium tuberculosis*; Nucleic acids; Clinical trial; Reagent kits, diagnostic

肺结核是由结核分枝杆菌复合群(*Mycobacterium tuberculosis* complex, MTBC)引起的一种传染性疾病,是全球的主要传染性疾病之一。近年来,在结核病诊断领域最大的突破是 MTBC 核酸检测试剂的临床应用。笔者所指的 MTBC 核酸检测试剂是指利用分子生物学方法(常用方法为荧光定量 PCR 法)以 MTBC 共有的核酸序列为目标序列,对痰样本中的 MTBC 核酸进行体外定性检测的试剂,可用于肺结核的辅助诊断。

迄今为止,国内外已有多种 MTBC 核酸检测试剂获准在中国上市。鉴于我国结核病防治面临的严峻形势,国家在政策、科技及产业化层面逐渐加大了对结核病诊断、治疗、管理和服务等方面的投入,因此,正在进行注册申报或者预期研发该类试剂的生产企业日渐增多。为了规范此类试剂的申报,参考美国食品药品监督管理局的相关文件和技术标准,结合审评中对国内外企业有关该部分资料的理解与总结,现对此类试剂在临床试验中应关注的要点进行介绍与解析^[1-3]。

一、MTBC 核酸检测试剂的优势

MTBC 核酸检测试剂临床应用的核心价值在于:(1)敏

感度大大提高,即使样本中只有极低拷贝数的细菌也能检出。某些已上市的核酸检测试剂的敏感度可达到 10 个菌/ml(最低检测限),而培养法为 100 个菌/ml,涂片法为 1000 个菌/ml。因此,核酸检测试剂可提高痰涂片阴性肺结核的检出率,在临床上可用于涂阴肺结核的辅助诊断。根据 2010 年全国结核病流行病学抽样调查结果,涂阴肺结核占我国肺结核患者的比率高达 50%~85%。因此,核酸检测试剂在结核病的辅助诊断中具有较高的价值。(2)核酸检测试剂常用方法为荧光定量 PCR 法,从痰液样本的前处理到检测结果的报告,一般 24 h 之内即可完成;而培养鉴定方法则长达 1 个月之久。因此,核酸检测试剂可相对快速地鉴别 MTBC 菌株与非结核分枝杆菌,以对患者及早进行正确的医疗处置。(3)核酸检测试剂扩增靶标为 MTBC 特异的序列,目标序列的检出意味着样本中存在 MTBC 菌株。相比于仅从形态上进行区分的涂片方法(仅能从形态上判断是否为分枝杆菌,无法区分 MTBC 和非结核分枝杆菌),核酸检测试剂可提高肺结核诊断的特异度^[4-5]。

二、临床试验方案

在临床试验开始前,临床试验研究者应与申请人一起讨论,从流行病学、临床医学、统计学等多方面考虑,设计科学合理的临床试验方案。不同临床试验机构的临床试验方案应基本一致,便于进行统计分析。临床试验过程应严格遵守既定方案。临床试验方案应确定严格、科学合理的样本入选和排除标准。任何入选的样本被排除出临床试验都应进行记录并明确说明理由。临床方案的设计应严格遵守《体外诊

断试剂临床试验技术指导原则》^[2]的相关要求。

三、临床试验机构

MTBC 核酸检测试剂属于第三类体外诊断试剂,应在不少于 3 家(含 3 家)获得国家食品药品监督管理总局资质认可的临床试验机构进行临床试验。目前,国家食品药品监督管理总局尚未公布已获资质认可的临床试验机构目录,申请人可选择省级以上卫生医疗机构开展临床试验。申请人应根据产品的特点及预期用途,综合考虑不同地区人种、流行病学、病原微生物的特性等因素,合理选择临床试验机构。由于我国非结核分枝杆菌的分布存在较大的地域差异,为了更好地验证申报产品的特异性,建议申请人在临床试验机构选择时应注意其地域代表性。

四、临床试验用样本

MTBC 核酸检测试剂的核心价值是提高涂阴结核病患者的检出率,并进行鉴别诊断。2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告显示,由于地域和统计方法的差异,涂阳肺结核占所有肺结核患者的比率约在 15%~50%^[6]。审评过程中发现,在临床试验中,为了获得较高的敏感度和特异度,申请人和临床试验机构倾向于选择涂阳肺结核患者作为病例组,选择健康人作为对照组;而忽略了涂阴肺结核患者及易与肺结核相混淆的其他疾病的患者。这样的病例选择原则,无法真实地反映实际临床发病特征,因此,无法对 MTBC 核酸检测试剂在肺结核辅助诊断中的核心价值(即提高涂阴肺结核患者的检出率和进行鉴别诊断)进行充分验证。因此,建议申请人和临床试验机构在选择临床试验对象时应充分考虑以下几点^[6-7]:(1)应选择具有肺结核症状和(或)体征的疑似肺结核患者,不建议选择正常健康人群;(2)肺结核患者例数不少于 350 例,并且涂阴肺结核占所有肺结核患者的比率至少为 50%;(3)应包括其他易混淆疾病(如肺炎、肺癌等疾病),此部分患者至少 150 例,以便对申报产品的特异度进行评价。上述病例选择的基本原则,在满足相关法规规定的至少 500 例样本的前提下,充分考虑了肺结核疾病的特性及临床发病率,保证了临床试验评价的客观性与科学性。

五、临床试验对比试剂

1. 采用已上市同类产品作为对比试剂:迄今为止,国内外至少已有 25 种 MTBC 核酸检测试剂获准在中国上市。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;采用申报产品与对比试剂进行比较研究,证明申报产品与已上市的同类产品等效或优于已上市产品。

鉴于目前获准上市的同类试剂的靶基因及敏感度等性能可能存在差异,建议申请人在进行临床试验前,选择几家上市试剂进行预试验,以便选择与申报产品性能相似,且临床认为质量较好的同类试剂作为对比试剂。

申请人应选择至少 500 例临床样本,采用申报产品与对比试剂进行比对试验,以评价申报产品与已上市产品的等效性。同时,申请人还应选择至少 100 例临床样本(涂阴和涂

阳分别至少 50 例)进行申报产品与培养鉴定方法(金标准)的对比研究,以评价申报产品的临床敏感度和特异度。培养方法可以采用传统的罗氏固体培养或液体培养方法,菌种鉴定方法可采用对硝基苯甲酸、测序或其他已上市的核酸检测试剂盒等^[8-9]。

2. 选择基因测序作为对比方法:随着基因测序的普及,其在临床的应用也越来越广泛。而且,由于基因测序的成本较低,且是分子生物学方法的“金标准”,基因测序在核酸类检测试剂的临床试验中受到很多申请人的青睐。但是,鉴于测序步骤复杂且耗费劳动力,虽然很多临床试验机构配备了测序仪,但是愿意开展测序业务的临床试验机构非常少。因此,提醒申请人和临床试验机构在选择基因测序作为金标准时,应充分考虑临床试验的可行性及延续性。如果选择了该方法作为对比方法,应在临床试验资料中对选用的基因测序方法做详细的介绍,包括如下几点:(1)提供测序原理、测序仪型号、测序试剂、测序引物等信息;(2)验证测序方法的分析性能(如最低检测限),建议将测序方法与申报产品的性能进行比对分析;(3)提交有代表性的样本测序图谱及结果分析;(4)测序方法还应设置阳性和阴性质量控制。所有测序资料均需要临床试验机构盖章,不可由申请人与第三方测序机构签署委托测序协议。

六、样本前处理方法和核酸提取方法的临床验证

痰液是 MTBC 核酸检测试剂最常用的样本类型。在进行样本核酸提取前,需先对痰液样本进行液化除菌等前处理。目前临床常用的痰液前处理方法至少有 3 种,分别为碱处理-直接法、N-乙酰-L-半胱氨酸法和碱处理-中和离心沉淀法等^[8]。如果申报产品涉及几种样本前处理方法,在临床试验时,建议至少进行 150 例同源样本(1 份临床样本分成几份,分别采用不同的前处理方法进行处理)的临床比对。其中,肺结核至少 100 例(涂阴肺结核占所有肺结核的比率至少为 50%),其他易混淆疾病的样本至少 50 例^[6-7]。

目前,国家食品药品监督管理总局并未要求申报产品试剂盒的组成中必须包括核酸提取成分。因此,申请人在设计开发产品时,其试剂盒本身往往并不包括核酸提取成分,而是配套使用其他厂家的一种或多种核酸提取试剂盒,用于申报产品样本的核酸提取。如申报产品称痰样本可采用几种方法进行核酸提取,在临床试验中,建议至少进行 150 例同源样本(1 份临床样本分成几份,分别采用不同的核酸提取方法进行处理)的临床比对。其中,肺结核至少 100 例(涂阴肺结核占所有肺结核的比率至少为 50%),其他易混淆疾病的样本至少 50 例^[6-7]。

七、临床试验报告中需要注意的其他问题

临床试验报告中需要注意的其他问题包括如下几点:(1)应在临床试验报告中详细描述申报产品与对比试剂的试验方法,并与试剂盒的说明书保持一致。(2)应在临床报告中明确总样本数、肺结核患者总例数、涂阴和涂阳肺结核患者数、易混淆疾病患者例数,以便判断病例选择的合理性。(3)临床原始数据应包括患者的年龄、性别、涂片结果、临床

诊断结果(明确为何种疾病,而不是症状的描述)、申报产品的结果、对比试剂的结果等。(4)结果差异样本的处理方法。

对于申报产品和对比试剂检测结果不一致的样本,应采用金标准或其他合理的方法进行复核,同时结合患者的临床病情对产生差异的原因及可能的结果进行分析。

相比于病毒而言,细菌的基础研究和临床实践相对滞后。鉴于结核病诊断的复杂性,MTBC 核酸检测试剂的临床设计和临床试验较其他病原体检测试剂更为复杂。为了从临床角度验证申报产品的敏感度和特异度,希望临床试验机构和申请人在设计此类试剂的临床试验方案时,不仅要考虑对比试剂选择的合理性,更要考虑临床研究样本选择的科学性,在设定病例入选和删除标准时要非常谨慎。

参 考 文 献

- [1] Bloemberg GV, Voit A, Ritter C, et al. Evaluation of Cobas TaqMan MTB for direct detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in comparison with Cobas Amplicor MTB. J Clin Microbiol, 2013, 51(7):2112-2117.
- [2] 国家食品药品监督管理总局. 关于发布体外诊断试剂临床试验技术指导原则的通告[EB/OL]. (2014-09-11)[2016-06-21]. <http://www.sda.gov.cn/WS01/CL0087/106241.html>.
- [3] U. S. Food and Drug Administration. Class 11 special controls

guideline; nucleic acid-based in vitro diagnostic devices for the detection of *Mycobacterium tuberculosis* complex in respiratory specimens-guideline for industry and Food and Drug Administration Staff [EB/OL]. (2014-05-30)[2016-06-21]. <http://www.fda.gov/MedicalDevices/DeviceRegulationandGuidance/GuidanceDocuments/ucm357617.htm>.

- [4] 路晓红, 付玉荣, 伊正君. 基于核酸检测诊断结核分枝杆菌感染的研究进展. 中国人兽共患病学报, 2015, 31(10): 967-971.
- [5] 卢水华, 肖和平. 结核病诊断新技术及其评价. 中国实用内科杂志, 2015, 35(8): 651-654.
- [6] 全国第五次结核病流行病学抽样调查技术指导组, 全国第五次结核病流行病学抽样调查办公室. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告. 中国防痨杂志, 2012, 34(8): 485-505.
- [7] U. S. Food and Drug Administration. Statistical guidance on reporting results from studies evaluating diagnostic tests [EB/OL]. (2007-03-13)[2016-06-21]. <http://www.fda.gov/RegulatoryInformation/Guidances/ucm071148.htm>.
- [8] 中华医学会. 临床技术操作规范: 结核病分册. 北京: 人民军医出版社, 2004.
- [9] 梁瑞霞, 谷蕴婷, 董伟杰, 等. 两种分子检测技术快速诊断骨关节结核及其耐药性的研究. 中国防痨杂志, 2015, 37(11): 1126-1129.

(收稿日期: 2016-06-21)

(本文编辑: 李敬文)