

附件 5

抗菌药物临床试验微生物学实验技术指导原则

药审中心

2020 年 12 月

目录

一、概述.....	1
(一) 临床微生物学实验的重要性.....	1
(二) 目的.....	1
(三) 适用范围.....	1
二、临床微生物学实验室需具备的基本条件.....	2
(一) 微生物学实验室设置条件.....	2
(二) 微生物学实验室资质条件.....	2
三、临床微生物学实验技术要求.....	3
(一) 标本要求.....	3
(二) 菌种鉴定.....	6
(三) 菌种保存、复苏和运输.....	6
(四) 微生物免疫学检测标本的保存和运输.....	7
(五) 菌种和标本的接收.....	7
(六) 菌种鉴定的复核.....	8
(七) 菌种鉴定复核结果的反馈和对反馈意见的处理.....	9
(八) 抗菌药物敏感性试验.....	9
(九) 非培养技术病原学相关检测.....	10
(十) 临床微生物学中心实验室报告.....	11
四、临床微生物学实验室的生物安全和保密制度.....	12
(一) 生物安全制度.....	13
(二) 数据管理和保密制度.....	14
五、参考文献.....	16

抗菌药物临床试验微生物学实验技术指导原则

一、概述

（一）临床微生物学实验的重要性

基于抗菌药物的特点，抗菌药物临床试验需要从临床疗效和微生物学疗效两个方面评价抗菌药的有效性，病原学诊断、临床分离病原菌的敏感性和耐药性等是抗菌药物临床试验的重要组成部分，临床微生物学实验技术与检测结果是微生物学疗效评价的重要基础，是抗菌药物安全有效性的综合判定、临床定位、说明书撰写的重要依据，也是抗菌药物合理使用和科学监管的基础。

（二）目的

本指导原则阐述与抗菌药物临床试验相匹配的微生物学实验的基本技术要求和管理要求，主要对药品注册申请人和临床试验研究者有关的抗菌药物临床试验微生物学实验研究提出原则性技术要求，对微生物学实验研究报告撰写提出了基本要求，同时也对临床试验过程中的临床微生物学实验室管理提出了基本要求，确保抗菌药物临床试验质量并能实现临床试验的目的。

（三）适用范围

本指导原则主要适用于抗菌药物临床试验微生物学疗效评价中对于微生物学实验质量的基本考虑。

二、临床微生物学实验室需具备的基本条件

（一）微生物学实验室设置条件

1. 临床微生物学实验室应当满足生物安全的需要，至少符合生物安全 2 级（BSL-2）标准；尽可能避免和/或减少病原微生物对实验室内、外部环境的污染；有足够空间放置仪器设备，工作人员能够安全地从事各项研究工作及质量控制活动。

2. 临床微生物学实验室应制定安全处理标本的操作规程，至少包括遵循标准预防措施，使用密闭、防渗漏容器运送标本；处理标本时应符合生物安全等级标准；含有经空气传播的病原体的标本或具有潜在危险的操作应在 2 级或以上生物安全柜内进行，必要时工作人员应接种疫苗、戴防护面具等。

3. 临床微生物学实验室设施与环境应与微生物的危害程度相适应，设备和试剂应满足实验要求。

4. 临床微生物学实验室应制定相应文件及程序监控标本质量和实验研究全过程，明确纠错的规范性操作要求。

5. 临床微生物学实验室应制定质量控制和质量保证程序以及标准操作规程。

（二）微生物学实验室资质条件

临床微生物学中心实验室必须是国家卫生行政管理部门的能力验证项目《全国临床微生物室间质量评价活动

(EQA)》或省、市和地区的能力验证项目室间质量评价活动(EQA)的合格者,至少通过ISO15189或ISO17025等中国评定国家认可委员会(CNAS)认可,取得认可证书。

临床微生物学分中心实验室必须是国家卫生行政管理部门的能力验证项目室间EQA或省、市和地区的能力验证项目室间EQA的合格者。

三、临床微生物学实验技术要求

依据抗菌药临床试验适应证和目标病原菌的要求,临床微生物学实验工作的开展需遵守相关公认的卫生行业标准临床微生物学检验相关的技术标准和操作规程,并规范性地使用中华人民共和国国家卫生健康委员会(含原中华人民共和国卫生部)及有关部门印发的卫生行业标准和操作规程,按照临床试验方案要求制定相应的微生物学检验工作手册。重要的临床微生物学实验技术要求如下:

(一) 标本要求

根据多中心临床试验不同的目标适应证,对标本的种类、采集和运输需满足下列要求:

1. 标本的种类

提供进行微生物学检查的临床标本可包括:

(1) 细菌学检测标本: ①血液; ②下呼吸道痰液、支气管分泌物或支气管肺泡灌洗液等; ③清洁中段尿(以下称尿液); ④脓液、创面分泌物或穿刺抽吸液; ⑤腹腔脓液; ⑥脑

脊液及⑦胸腹水穿刺液，等。

(2) 抗原或抗体检测标本：血清、尿液等。

(3) 核酸检测标本：必要时提供对特殊病原微生物，如肺炎支原体等检查的呼吸道标本(痰液、支气管分泌物等)。

2. 标本采集的时间

基线标本必须在未使用研究药物前采集，访视期的标本采集次数及各次采集时间依据临床试验方案要求而定。

3. 标本的采集和运送

按卫生行业标准 WS/T 640 临床微生物学检验样本的采集和转运要求。

4. 标本的处理和要求

采集的临床标本应及时送达分中心实验室，并按常规及时对各类标本进行处理。

(1) 下呼吸道痰液或支气管分泌物 ①必须先予痰涂片、革兰染色和镜检，镜检结果示低倍镜下平均每个视野白细胞 ≥ 25 个，鳞状上皮细胞 ≤ 10 个为合格标本，可进行痰细菌培养；②标本不合格者，应尽快通知研究者重新采样送检；③临床研究者将依据痰涂片镜检的最终结果评价患者是否可入组成为受试者；④对痰涂片镜检结果实验室需出具报告，应描述革兰染色反应、细菌形态和排列、及推测可能的细菌种类，以备原始资料溯源。

(2) 尿液标本需注意留取清洁中段尿，同时送检尿常规

及尿培养和尿菌落计数。

（3）脓液、伤口分泌物或穿刺抽吸液标本 此类标本多取自于复杂性皮肤和皮肤结构感染患者，须按封闭性和开放性脓肿规范采集。采集的脓液或分泌物标本需进行涂片、革兰染色和镜检。并将涂片中观察到的细菌染色属性及细菌形态特征加以描述后报告给标本送检者，有助于预估感染病原菌，对患者是否可入组提供参考。取自深部脓肿等的化脓性病灶标本如抽吸液等常为需氧菌和厌氧菌混合感染需同时进行需氧和厌氧培养。

（4）腹腔脓液标本 此类标本多取自于腹腔内感染患者。基线标本取自手术中腹腔内感染部位，疗程中可取自再次腹腔手术；腹腔内感染多为混合感染，需同时进行需氧菌和厌氧菌培养，并在厌氧环境的情况下立即送检；

（5）血标本 按常规同一次血培养标本应取自两处不同部位，均需进行需氧及厌氧培养。注意：血培养阳性结果并非均可诊断为血流感染不能排除有污染的可能。如血培养获凝固酶阴性葡萄球菌时多系污染，因此在血培养标本采集过程中需严格执行无菌操作和不同的解剖部位至少抽取双份双套标本。检验过程中需及时、准确将检测中的发现及时报告给送检者。包括①及时报告血培养报警时间（即危急值报告）以及对报警标本进行的革兰染色涂片镜检结果；②血培养双份标本培养结果的一致性，如双份标本均为培养阳性

者，其菌种鉴定和药敏测定结果是否一致。上述检验过程中获得的初步及最终结果应及时和准确报告，这将有助于研究者评估受试患者血流感染的诊断是否成立。一旦诊断为血流感染，在某些以非血流感染为目标适应证的临床试验中，受试者需及早退出试验；对于不属特定的目标病原菌感染的患者亦需退出试验。

（二）菌种鉴定

病原菌分离和鉴定方法及操作程序应符合卫生行业关于临床微生物学检验相关的技术标准和操作规程的要求，并须依据抗菌药临床试验对临床微生物学实验技术的要求，如非特殊说明，菌种必须鉴定到“种”的水平。

（三）菌种保存、复苏和运输

临床试验中的所有分离菌均需按规定进行菌种保存并定期将菌种运输到中心实验室进行菌种鉴定复核和稀释法药物敏感性试验。

1. 菌种编号 每一株分离菌株应获得明确唯一的菌种编号。菌种编号应包含有以下要素：①临床试验方案号；②临床试验分中心编号；③受试者的筛选号；④标本采集的访视期；

2. 菌种保存 宜选用菌种存活时间长、安全及便利的保存方法；保存的菌种需一式两份；分别放置两个 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 以下环境，也可按方案要求放置；

3. 菌种复苏 保存在 $\leq -70^{\circ}\text{C}$ 冰箱内的菌种在运往中心实验室前必须将菌种复苏活化，其活化过程和步骤需记录，以便溯源；

4. 菌种运输 经过“复苏”的菌种可以置于 Copan108C 运输管，并必须由申办方安排并委托具有生物制品运输资质的运输公司在常温下承运，安全运送到中心实验室。如研究需要采用其他冷冻方式运输菌种，则亦需由申办方按生物安全相关条款和合适的运输环境，如冷链、或干冰等方式进行运输。

（四）微生物免疫学检测标本的保存和运输

按临床试验要求提供对非典型病原体和苛养菌进行抗原抗体或核酸检测的血清、尿液等相关标本均应有明确唯一的标本编号；每份标本均需一式两份保存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 以下的环境中直至运输；运输时仍需在冷冻状态下；标本运输单和所有的检测申请单与标本同运。承运公司的要求同菌种运输的要求一样。

（五）菌种和标本的接收

中心实验室对分中心实验室送达的菌种和标本需核对信息和记录，以便日后溯源：

1. 核对菌种和标本的运送过程是否符合临床微生物学实验操作的要求；

2. 核对菌种管或标本管上的标签与相应信息单上的信

息是否符合；

3. 清点实际收到的菌种或标本数是否与运输单一致；
4. 检查菌种运输管或标本管在运输途中是否发生破损、菌种管内的菌种和培养基有否发生渗漏；
5. 将运输单、菌种和标本信息单归档；
6. 菌种应立即划线分离培养、标本应分别一式两份保存在 $\leq -20^{\circ}\text{C}$ 及以下的冰箱内至检测时取出。

（六）菌种鉴定的复核

中心实验室对分中心实验室送交的菌种同样需要按照相关公认的临床微生物学行业技术标准和操作规程进行审核。

1. 观察和记录描述送检菌种是否为纯培养物或污染、存活或死亡情况；
2. 采用相应的菌种鉴定系统进行复核鉴定，必要时采用质谱技术补充鉴定；
3. 获得菌种鉴定结果后必须按菌种保存的操作要求进行一式两份保存；
4. 当分中心实验室的菌种鉴定结果与复核结果显示不一致时，中心实验室需作第二次复核。二次复核仍为同样结果时，则要求分中心实验室重送菌种，再次复核；
5. 再次复核结果与首次复核结果相同，则以中心实验室复核结果为准。

（七）菌种鉴定复核结果的反馈和对反馈意见的处理

一般情况下，中心实验室应在收到分中心实验室菌种后的7~10个工作日内须将结果以反馈报告形式交分中心实验室。反馈报告需包含以下内容：

1. 中心实验室菌种接受和相关信息收集的情况；
2. 中心实验室菌种鉴定复核结果，分中心实验室菌种鉴定是否正确；
3. 当菌种鉴定复核结果显示不一致时，分中心实验室需向中心实验室重送菌株；如复送的菌株经复核鉴定仍未能显示与中心实验室复核结果一致时，则需要求分中心实验室按中心实验室复核结果在原始记录中更正菌名；
4. 如送达的菌种污染或死亡、或所附信息资料不全时，中心实验室亦可通过反馈报告向分中心实验室提出重送菌种和补充完整信息资料的要求。

（八）抗菌药物敏感性试验

1. 病原体 应为临床试验项目内所有基线和各访视期的分离菌。

2. 抗菌药物 药敏试验测定的试验药物和对照药物原则上由申办者免费提供，并提供药品相关信息。应采用中国食品药品检定研究院标准品；或有资质的第三方提供的标准品或工作对照品。对照药品种除须包括临床试验的对照药外，尚可包括与国内临床沿用的受试抗菌药同类药的主要品种。

3. 药敏试验的方法如非特殊要求，原则上分中心实验室一般采用纸片扩散法测定临床试验药和对照药的抑菌圈直径；中心实验室采用肉汤微量稀释法测定试验药和对照药的 MIC；但厌氧菌需采用琼脂稀释法，肉汤微量稀释法仅限于脆弱拟杆菌等拟杆菌属和副拟杆菌属；试验中均需遵循相应的药敏试验规范和质控要求。

4. 药敏试验结果分析的依据 建议依据 CLSI 当年版本的折点标准进行药敏试验结果 S、I、或 R 的分析，如某些抗菌药品种没有 CLSI 折点标准，可参考能查阅到的 EUCAST 或 FDA 的折点。对于国内自主研发的新抗菌药物，可以使用我们国家自己制定的流行病学界值（ECV）。但研究者应在“临床微生物学操作手册”中需加以说明在使用的相应规范的折点标准时，其研究过程和报告均须按相关参考折点的文件要求执行。

5. 药敏试验报告 向申办者出具药物敏感性试验中所有临床试验基线分离菌的 MIC 值，并列表显示所有参与药敏试验抗菌药的 MIC₅₀ 和 MIC₉₀ 值，以及 S% 和 R% 等结果的检测报告。

6. 试验中如发现基线细菌未清除者，需测定基线分离菌与各访视期分离菌的 MIC，受试药对治疗前后分离菌的 MIC 值呈 ≥ 4 倍变化者，需引起重视。

（九）非培养技术病原学相关检测

考虑到某些病原微生物难以培养等特殊性，建议可采用免疫学检查（血清学、尿抗原等）及核酸检查等非培养技术，但仅推荐检测须在在中心实验室完成。临床试验中心实验室应按方案要求将各分中心实验室提供的血清学、尿抗原以及相关检查的标本采用直接免疫学检测或核酸检测方法进行病原学检测。与此同时，中心实验室须对对采用的方法学的灵敏度和特异性进行确认和验证，如先进行方法学验证或确认，再检测标本并进行质控。

（十）临床微生物学中心实验室报告

试验结束后，中心实验室应将全部入选病例的微生物学资料按病原学资料，包括菌种的信息、血清学和尿抗原等检测的结果以及药敏试验资料两个部分进行整理归类和分析，并出具报告。

1. 病原学资料

要求对临床分离菌、血清学和尿抗原检测等资料作综合分析。资料分析及报告可按方案要求，但应包括下列内容：

（1）受试者基线临床分离菌汇总表，并统计细菌标本培养分离阳性率；

（2）项目中如有受试患者血清学和尿抗原检测，需列表报告相关病原微生物检测情况汇总表，并统计检测阳性率及混合感染率。

2. 药物敏感性试验资料

采用合适的统计学软件对药敏试验中获得的结果进行数据处理和统计分析，并按下述要求出具测试报告。

(1) 列表描述临床试验中受试药和对照药对所有基线临床分离菌的 MIC 值；

(2) 原则上需按菌种统计分析受试药和对照药对临床分离菌的 MIC₅₀、MIC₉₀ 值和 MIC 范围，敏感率和耐药率；必要时也可将 < 10 株的同属细菌或同科细菌合并统计分析；

(3) 必要时还应按细菌的耐药表型不同，或证实可能有独特的耐药模式和/或耐药机制的细菌进行群体分类统计。如：

- ① 甲氧西林敏感或耐药金黄色葡萄球菌；
- ② 万古霉素敏感或耐药肠球菌属细菌；
- ③ 青霉素敏感或不敏感肺炎链球菌；
- ④ 产超广谱 β 内酰胺酶大肠埃希菌、肺炎克雷伯菌和奇异变形杆菌等；
- ⑤ 喹诺酮类敏感或耐药大肠埃希菌等；
- ⑥ 碳青霉烯耐药肠杆菌目细菌、鲍曼不动杆菌和铜绿假单胞菌等不发酵糖革兰阴性菌。

四、临床微生物学实验室的生物安全和保密制度

为实现临床微生物学实验室工作的全过程管理和质量控制，临床微生物学实验管理的基本要求和技术要求已于上述“三.临床微生物学实验技术要求”中加以说明。这里再次重申对项目实施过程中的生物安全和实验数据管理与保密制

度：

（一）生物安全制度

对项目研究中所发生的与微生物学操作相关活动和行为以及产生的结果，包括菌种保存、销毁、运输等均需制定生物安全措施，保证研究项目正常开展。

1. 法律法规

应遵照中华人民共和国国务院令《病原微生物学实验室生物安全管理条例》（中华人民共和国国务院令 第 424 号，2004 年 11 月 12 日颁发；2018 年 8 月 30 日修订）和卫生行业标准《病原微生物实验室生物安全通用准则》（WS 233-）。

2. 菌种保存

按国务院令 第 424 号文件第二章第十四条（病原微生物的分类和管理）的要求，认真保管好项目试验期间临床试验分离的所有菌种。

3. 菌种销毁

在项目结束后，申办方通知可以销毁菌种时，应按上述文件第二章“病原微生物的分类和管理”第十六条的要求销毁菌种，并要有详细的销毁记录。

4. 菌种运输

承运菌种或标本的运输公司必须遵照《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》（卫生部令 2005 年第 45 号）的要求实施运输。

（二）数据管理和保密制度

为保护受试者隐私和安全，保证临床试验的顺利实施，不遗失、不泄露任何实验数据，微生物学实验研究应真实、可靠、规范，具可溯源性及合规性，应满足 GCP 要求，同时体现抗菌药物临床试验微生物学实验要求。数据管理和保密制度的基本要求如下：

1. 资料备份

所有与试验有关的文件、数据、记录、报告需要有备份；包括相应的电子文档等；

2. 资料归档

方案执行过程中任何有关的记录均要及时妥善保存。这些资料包括：

（1）试验中产生的各种运输记录、申请单、菌种复核记录及反馈意见表、进程报告以及与申办者和研究者的来往信件或沟通记录等；

（2）整个试验项目结束之后，及时将试验数据和结果等按序整理、编号、目录、分类装订归档。文件归档的要求如下：

①中心实验室须对来自各分中心实验室的微生物学资料按各试验中心归档，资料应包括：菌种信息单、血清、尿抗原检查等申请单；

②菌种和各类标本的运输单、快递单及反馈报告的签收

单等全部编号归档，并装订成册；

③各临床试验分中心的实验室应参照上述要求将实验过程中发生的资料编号，并装订成册，以便溯源；

④中心实验室应将临床微生物学检查的原始资料归档和编号，包括：中心实验室菌种接受和鉴定复核结果登记表，菌种鉴定复核过程中的所有实验记录(如菌种鉴定复核单)，药敏试验记录单(包括 MIC 等测定数据及汇总表格等)，血清学和尿抗原等测定记录单等装订成册后归档；

3. 资料保管

与项目有关的原始资料，包括已经完成或正在进行检测的资料均应专人保管；

4. 资料保密

未获研究者和申办者授权或允许，不得借阅、拍照、修改、带离与项目研究相关的研究数据，如获授权借阅等须办理相应的手续和记录。

5. 资料保存和销毁

除上述 1.和 2.所指的需归档的纸质和电子文档外，还应包括整个项目研究期间所产生的菌种、血清和尿标本等所有研究样本，保存期限应满足至少保存至临床试验结束后 5 年的要求；或保存至申办方在获得监管机构批准该药生产批文后；或经申办者通知同意，可将该临床试验中的上述相关微生物学样本等作销毁处理，或交申办者另行处理。

五、参考文献

1. FDA Guidance for Industry: Microbiology Data for Systemic Antibacterial Drugs—Development, Analysis, and Presentation. 2016年8月.

2. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Thirty Informational Supplement, 2020 ,M100-S30.

3. 中华人民共和国卫生部医政司 全国临床检验操作规程(第四版)2015年3月2015年11月第1版第5次印刷.

4. 王辉,任健康,王明贵等. 临床微生物学检验; 2015年6月第1版; 2015年8月第1版第2次印刷.

5. SFDA. 抗菌药临床试验技术指导原则. 2015年4月.

6. 李娅杰. 美国 FDA 对抗菌药临床试验方案的考虑及其借鉴. 中国临床药理学, 2008; 24(3): 275-279.

7. Tomas R. Beam Jr, David N. Gilbert, and Calvin M Kunin. General Guidelines For the Clinical Evaluation of Anti-Infective Drug Products. Clin Infect Dis 1992; 15(Suppl) : S5-32.

8. 中华人民共和国卫生行业标准. 临床实验室生物安全指南. WS/T 442-2014.

9. 中华人民共和国卫生行业标准. 下呼吸道感染细菌培养操作指南. WS/T 499-2017.

10. 中华人民共和国卫生行业标准. 临床微生物实验室血培养操作规范. WS/T 503- 2017.

11. 中华人民共和国卫生行业标准. 尿路感染临床微生物实验室诊断. WS/T 489-2016.

12. 中华人民共和国卫生行业标准. 抗菌药抗菌药敏感性试验的技术要求. WS/T 639-2018.

13. 中华人民共和国卫生行业标准. 临床微生物学检验样本的采集和转运. WS/T 640-2018.

14. 中华人民共和国卫生行业标准. 侵袭性真菌病临床实验室诊断操作指南. WS/T 497-2017.

15. 中华人民共和国卫生行业标准. 临床实验室质量指标. WS/T 496-2017.

16. 中华人民共和国卫生行业标准. 病原微生物实验室生物安全通用准则. WS 233-2017.

17. 中华人民共和国国务院令(第 424 号). 病原微生物实验室生物安全管理条例. 2004 年 11 月 12 日颁发.

18. 中华人民共和国卫生部令(第 45 号). 可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定. 2005 年 12 月 28 日颁发.