

受理号：CSZ2300334

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：呼吸道病原体六重核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

产品管理类别：第三类

申请人名称：北京博晖创新生物技术集团股份有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、 申请人名称.....	3
二、 申请人住所.....	3
三、 生产地址.....	3
技术审评概述.....	4
一、 产品概述.....	4
二、 临床前研究概述.....	6
三、 临床评价概述.....	11
四、 产品受益风险判定.....	13
综合评价意见.....	15

基本信息

一、申请人名称

北京博晖创新生物技术集团股份有限公司

二、申请人住所

北京市昌平区生命园路9号院

三、生产地址

北京市昌平区生命园路9号院

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

试剂盒的主要组成成分见下表:

组分	名称	装量 (X 测试/盒)		数量	成分
		12	4		
试剂盒 I	扩增反应液	300 μ L	160 μ L	1 管	缓冲液、dNTPs、Taq 酶、UDG 酶、逆转录酶
	引物液 A	100 μ L	45 μ L	1 管	甲型流感病毒、乙型流感病毒、百日咳鲍特菌和内参 4 个靶标的引物和探针
	引物液 B	100 μ L	45 μ L	1 管	腺病毒、呼吸道合胞病毒、肺炎支原体和内参 4 个靶标的引物和探针
	Carrier RNA	82 μ L	33 μ L	1 管	Carrier RNA
	蛋白酶 K	190 μ L	100 μ L	1 管	蛋白酶 K
	阳性质控品	220 μ L	220 μ L	1 管	含六个目标靶点基因的假病毒 (质粒) 和 HEK293 细胞
	阴性质控品	350 μ L	350 μ L	1 管	HEK293 细胞
试剂盒 II	磁珠	440 μ L	200 μ L	1 管	磁珠
	润洗液	1mL	500 μ L	1 管	BSA
	洗脱液	1mL	500 μ L	1 管	Tris、EDTA
试剂盒 III	硅油	1.2 mL	1.0 mL	1 管	硅油
	裂解液 C	3mL	1.5 mL	1 管	异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠、二硫苏糖醇
	异丙醇	3mL	1.5 mL	1 管	异丙醇
	漂洗液 1A	3mL	1.5 mL	1 管	盐酸胍、异丙醇
	漂洗液 2A	3mL	1.5 mL	1 管	乙醇

备注: 1. 不同规格或批次的试剂盒组分不得混用。

2. 需要但未提供的材料和设备: 200 μ L 移液器及配套枪头, 博晖微流控仪器配套芯片(货号: 130000102)和枪头。

(二) 产品预期用途

本产品用于定性检测人咽拭子样本中的呼吸道病原体，包括甲型流感病毒（季节性 H1N1、新型甲型 H1N1 流感病毒（2009）、H3N2、H5N1、H7N9）、乙型流感病毒（Victoria 系和 Yamagata 系）、腺病毒（B 组、C 组、E 组）、呼吸道合胞病毒（A 亚型和 B 亚型）、肺炎支原体和百日咳鲍特菌。

本产品可区分样本中上述 6 种病原体，但不区分同一病原体的具体型别，检测结果可用于呼吸道病原体感染的辅助诊断。

（三）产品包装规格

12 测试/盒，4 测试/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒以待检测病原体的保守序列为靶序列，设计特异性 PCR 扩增引物及 Taqman 探针，采用一步法 RT-PCR 对目标靶点进行扩增和实时荧光检测并绘制出扩增曲线，根据扩增曲线的 Ct 值判断样本的阴阳性。试剂盒设计了内参及外标质控品（阳性、阴性质控品）对检测过程进行质量控制。内参采用人核糖核酸酶 P (Ribonuclease P, RNaseP) 基因设计引物探针，通过检测样本中内参监测待测样本质量、提取及荧光 PCR 过程。试剂盒设置阴、阳性质控品，用于监测提取及荧光 PCR 过程。同时引入 dUTP/UDG 防污染系统，以保障检测过程的准确性。

本产品依托微流控技术，在配套芯片（泵液芯片模块，以下简称“芯片”）上实现从样本到结果的一站式操作。只需将试剂、试剂架和芯片放入仪器的指定位置，将待测样本加入芯片的加样孔中，点击

鼠标加载运行程序，仪器就可以实现核酸提取纯化、PCR、荧光采集及结果判读。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

本产品制备过程中主要原材料包括 Carrier RNA、磁珠、引物、探针、扩增反应液、含 FluA、B 假病毒、RSV 假病毒，AdV 假病毒、M.P 质粒、B.P 质粒和 HEK293 细胞的混合液。其中 Carrier RNA、磁珠、引物、探针、扩增反应液、FluA、B 假病毒、RSV 假病毒，AdV 假病毒、M.P 质粒、B.P 质粒为外购，HEK293 细胞为申请人自行生产。

申请人对主要原材料进行了供应商的选择，通过功能性试验，筛选出合格供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

企业参考品和质控品的设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、检测限参考品和精密度参考品。参考品均采用病原体培养物制备而成。组成如下：

阳性参考品：20 份，由试剂盒检测位点各个基因型别的病原体培养物组成。

阴性参考品：10 份，由试剂盒检测范围外的病原体培养物组成。

精密度参考品：3 份，由中强阳性、弱阳性和阴性浓度水平的病原体培养物组成。

检测限参考品：20 份，由包含试剂盒检测位点各个基因型别的最低检测限浓度水平的病原体培养物组成。

本试剂盒设置了阴性质控品为 HEK293 细胞；阳性质控品为含六个目标靶点基因的假病毒（质粒）和 HEK293 细胞，用于检测过程中试剂和仪器的质量控制。

（二）生产工艺及反应体系研究

申请人通过企业内部参考品试验确定最佳的生产工艺及反应体系，包括：核酸提取试剂、PCR 扩增试剂和质控品的配液工序、分装工序及组装工序等，同时对蛋白酶K、Carrier RNA、磁珠、裂解液C、漂洗液1A、漂洗液2A、异丙醇、润洗液、洗脱液、硅油等试剂组分量以及样本上样量等条件进行了研究，并对反转录条件、PCR 扩增程序、反应体积等反应条件进行研究，还包括对样本类型的研究、样本稳定性的研究。

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳的生产工艺。

（三）分析性能评估

本试剂盒分析性能评估主要包括：包括阴阳性符合率（准确性）、精密度、特异性、最低检出限，包容性等，申请人提交了质量管理体系下生产的三批产品在适用机型上的性能评估资料。

1. 准确度

在准确度研究中，申请人采用三批试剂盒对企业参考品及临床样本在所有适用机型上进行准确度评价。结果表明检测企业参考品阴性符合率为 100%，阳性符合率为 100%；检测临床样本，与对比试剂检测结果总一致率 96.08%，阳性符合率为 96.34%，阴性符合率为 95.00%；与一代测序检测结果全部一致。

2. 精密度

精密度研究中，申请人使用三批试剂对阴性临床样本 2 份、临界阳性临床样本 9 份、中阳性临床样本 9 份，共 20 份临床样本进行精密度研究。重复性和室内精密度评价试验模型为 $20 \times 2 \times 2$ ，实验室间精密度评价试验模型为 $3 \times 5 \times 5$ 。研究结果表明产品的重复性、室内精密度、再现性精密度和批间精密度 CV 均 $\leq 5\%$ ，满足产品技术要求。

3. 特异性

分析特异性研究包括交叉反应研究、竞争性干扰研究和内外源干扰研究。

在交叉反应性能评估中，申请人使用一批试剂对试剂盒检测范围内 6 个病原体之间及与检测范围内病原体有相同基因或基因序列有同源性、呼吸道常见病原体等试剂盒检测范围外的 43 种病原体，包括副流感 1、副流感 2、副流感 3、副流感 4、肠道病毒 EV71、EB 病毒、人巨细胞病毒、肺炎衣原体、鼻病毒 A30 型、人偏肺病毒 A2 型、博卡病毒、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌 14 型、白念珠菌、嗜肺军团菌、干乳酸杆菌、副百日咳博德特氏菌、表皮葡萄球菌、肺炎克雷伯菌、卡他莫拉菌、唾液链球菌、棒状杆菌属、化脓性链球菌、星状诺卡氏菌、黏质沙雷氏菌、柠檬酸杆菌属、新型隐球酵母、大肠埃希氏菌、鲍曼不动杆菌、绿脓假单胞菌、洋葱伯克霍尔德氏菌、纹带棒杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、胺脲罗斯氏菌、烟曲霉、黄曲霉、脑膜炎奈瑟菌、口腔链球菌、单纯疱疹病毒 I 型、水痘带状疱疹病毒、奈瑟氏菌属、肺孢子菌进行交叉反应评价，结果表明试剂盒检测范围

内的 6 个病原体之间没有交叉反应，与检测范围内病原体有相同基因或基因序列有同源性、呼吸道常见病原体等试剂盒检测范围外的 43 种病原体无交叉反应。

在竞争性干扰研究中，申请人使用三批试剂对同一反应体系内不同病原体间的竞争性干扰进行评估，根据临床上常见的呼吸道病毒混合感染情况，分析同一反应体系内高浓度病原体对低浓度病原体检测的影响。结果表明样本中存在同一体系内的两种或三种靶标时，不会出现内部竞争抑制作用。

在干扰研究中，申请人使用一批试剂对鼻咽中潜在的 29 种内、外源性干扰物质（包括全血、粘蛋白、鼻和咽喉中用于缓解鼻塞、鼻腔干燥、刺激或哮喘和过敏症状的药物，以及抗生素和抗病毒药物），使用单阳临界阳性水平及混合阳临界阳性水平样本进行检测。结果表明，内源物质 2.5% (w/v) 粘蛋白、2% 全血及高浓度人体细胞 (10^6 个/mL, 内参) 不影响检测结果。采样过程中可能引入的干扰物质：15% (v/v) 羟甲唑啉、50 mg/L 地塞米松、100 mg/mL 曲安奈德、320 mg/L 布地奈德、10 mg/mL 孟鲁司特纳、50 mg/L 金刚烷胺、7.5 mg/L 利巴韦林、7.5 mg/L 奥司他韦、10 mg/mL 左氧氟沙星、10 mg/mL 诺氟沙星、30% 漱口水、500 mg/L 莫匹罗星、1% (v/v) NaCl、1.7 mg/mL 薄荷脑、100 mg/L 妥布霉素、10 mg/mL 盐酸非索非那定、150 mg/L 莫米松、100 μ g/mL 苯福林、250 μ g/mL 倍氯美松、10 μ g/mL 氟尼缩松、250 μ g/mL 氟替卡松、50 μ g/mL 盐酸组胺、50 μ g/mL 苯佐卡因、100 μ g/mL 扎那米韦、100 μ g/mL 帕拉米韦，不会影响试剂盒

检测结果的判定。50 $\mu\text{g/mL}$ 冻干鼻喷流感减毒疫苗有可能会影响甲型流感病毒和乙型流感病毒检测结果，对于使用鼻喷流感减毒疫苗的患者，有可能会出现甲型流感病毒和乙型流感病毒假阳性。

4.最低检出限

申请人使用三批试剂对试剂盒检测范围内病原体亚型的培养物及临床样本（50 株培养物、40 例临床样本）进行最低检出限研究。以检出率 $\geq 95\%$ 时所对应的浓度水平确定试剂盒的检出限，并进行最低检出限验证。结果表明试剂盒的最低检出限为 2000 拷贝/mL，对应滴度最低检出限为甲型流感病毒 3.20 TCID₅₀/mL、乙型流感病毒 7.66 TCID₅₀/mL、腺病毒 0.93 TCID₅₀/mL、呼吸道合胞病毒 0.82 TCID₅₀/mL、百日咳鲍特菌 107.48 CFU/mL。

5.包容性

申请人使用三批试剂对具有时间和地理多样性的 3 个不同来源共 54 株临床样本进行包容性研究，临床样本包括 H1N1 3 株、09H1N1 3 株、H3N2 3 株、H5N1 3 株、H7N9 3 株、B/Victoria 3 株、B/Yamagata 3 株、B.P 3 株、Adv1 型 3 株、Adv2 型 3 株、Adv3 型 3 株、Adv4 型 3 株、Adv5 型 3 株、Adv7 型 3 株、Adv55 型 3 株、RSVA 亚型 3 株、RSVB 亚型 3 株、M.P 3 株。结果表明试剂盒包容性满足要求。

（四）阳性判断值研究

阳性判断值的确定：选取来不同地区有明确诊断信息的 400 例临床样本进行研究。分别纳入试剂盒检测范围内的 6 种单阳样本及常见混合阳样本，共 273 例阳性样本，阴性样本 127 例，使用本试剂盒进

行检测，采用 ROC 曲线法进行统计分析，确定试剂盒各病原体及内参的阳性判断值均为 40。

阳性判断值验证：选取来自不同地区有明确诊断信息的 200 例临床样本进行验证，结果表明，阳性判断值为 40 时，试剂盒检测范围内 6 个病原体的检测结果与对比方法的符合率在 99% 以上，本试剂盒阳性判断值设置合理。

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的效期稳定性、冻融稳定性、运输稳定性以及样本稳定性进行研究，确定了在各种条件下本产品及样本的有效保存时间。

效期稳定性：使用企业参考品对三批试剂按照技术要求检测，分别于试剂盒保存的第 0 个月、6 个月、10 个月、12 个月、15 个月进行稳定性试验；检测结果均符合技术要求。因此，试剂盒按照说明书要求可保存 12 个月，检测性能稳定。

此外，申请人对产品的冻融稳定性、运输稳定性和样本稳定性分别进行了研究，结果显示，产品的性能均满足产品说明书声称的要求。

三、临床评价概述

申请人在首都儿科研究所附属儿童医院、广州医科大学附属第三医院和济南市儿童医院共 3 家机构完成了临床试验。入组人群为呼吸道感染的患者，样本类型为咽拭子。

针对甲型流感病毒、乙型流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒和肺炎支原体核酸检测，临床试验采用试验体外诊断试剂与已上市同类

产品进行比对，入组病例 2150 例。

针对甲型流感病毒，纳入阳性病例 263 例，阴性病例 1887 例。试验结果显示，阳性符合率为 98.1% (95CI: 95.6%, 99.2%)，阴性符合率为 99.3% (95CI: 98.8%, 99.6%)；

针对乙型流感病毒，纳入阳性病例 212 例，阴性病例 1938 例。试验结果显示，阳性符合率为 100% (95CI: 98.2%, 100%)，阴性符合率为 99.5% (95CI: 99.1%, 99.8%)；

针对腺病毒，纳入阳性病例 277 例，阴性病例 1873 例。试验结果显示，阳性符合率为 96.4% (95CI: 93.5%, 98.0%)，阴性符合率为 99.7% (95CI: 99.4%, 99.9%)；

针对呼吸道合胞病毒，纳入阳性病例 224 例，阴性病例 1926 例。试验结果显示，阳性符合率为 99.6% (95CI: 97.5%, 99.9%)，阴性符合率为 99.2% (95CI: 98.7%, 99.5%)；

针对肺炎支原体，纳入阳性病例 251 例，阴性病例 1899 例。试验结果显示，阳性符合率为 98.8% (95CI: 96.5%, 99.6%)，阴性符合率为 99.3% (95CI: 98.8%, 99.6%)。

针对百日咳鲍特菌核酸检测，临床试验采用试验体外诊断试剂与 Sanger 测序进行比较研究，共入组 2150 例病例，包括阳性病例 352 例，阴性病例 1798 例。试验结果显示，阳性符合率为 99.7% (95CI: 98.4%, 99.9%)，阴性符合率为 99.8% (95CI: 99.5%, 99.9%)。同时还进行了与百日咳鲍特菌培养鉴定的比较，包括培养阳性病例 85 例，培养阴性病例 810 例。灵敏度为 98.8% (95CI: 93.6%, 99.8%)，

特异度为 70.1% (95CI: 66.9%, 73.2%)。针对与培养鉴定不一致的样本, 均结合 Sanger 测序进行了确认。

综上所述, 临床试验结果显示本产品与对比方法的一致性较好, 满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

本产品根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对本产品的安全风险分析方式, 对本产品进行风险分析。

(一) 受益评估

产品通过对患者咽拭子样本中的六项呼吸道病原体核酸的定性检测, 一次性获得多个病原体的检测结果, 避免重复采样可能带来的痛苦, 供临床诊断参考, 为呼吸道感染性疾病的临床诊疗提供一种更多的辅助诊断方法, 提高诊断效率。

(二) 风险评估

申请人对已知危险(源)进行风险评价, 按照风险可接受准则判断每个危险(源)的风险是否达到可接受水平, 对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施, 并对具体措施进行实施验证, 同时重新对采取措施后的风险进行估计, 确认其风险水平是否可接受。但为保证用械安全, 基于对主要剩余风险的规避, 需要在说明书中提示以下信息:

- 1.与预期用途有关的风险, 例如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。

2.与储存或运输相关的风险，例如产品储存条件不达标，产品运输条件不达标。

3.与使用有关的风险，例如不合理的样本采集、处理方法，其他样本类型或样本采集、处理方法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；检测芯片使用前请确保八联排 PCR 管与芯片贴合得紧密无缝，如有松动现象应人工安装紧固后再使用；注意轻拿轻放，放置到仪器上时请保证八联排 PCR 管置于仪器上的加热模块内。芯片开封后如暂时不用，请放置于干燥环境内，并尽快使用。

4.与防护有关的风险，仪器使用时需关闭仪器舱门，操作者穿工作服和一次性手套，万一试剂与皮肤、粘膜接触，请立即用自来水冲洗。

5.警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检查方法的局限性及使用中的注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类体外诊断试剂产品注册。依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第 739 号）、《体外诊断试剂注册与备案管理办法》（国家市场监督管理总局令第 48 号）等相关医疗器械法规与配套规章，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2024 年 9 月 6 日

附件：产品说明书

呼吸道病原体六重核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：呼吸道病原体六重核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

12 测试/盒，4 测试/盒

【预期用途】

本产品用于定性检测人咽拭子样本中的呼吸道病原体，包括甲型流感病毒（季节性 H1N1、新型甲型 H1N1 流感病毒（2009）、H3N2、H5N1、H7N9）、乙型流感病毒（Victoria 系和 Yamagata 系）、腺病毒（B 组、C 组、E 组）、呼吸道合胞病毒（A 亚型和 B 亚型）、肺炎支原体和百日咳鲍特菌。

本产品可区分样本中上述 6 种病原体，但不区分同一病原体的具体型别，检测结果可用于呼吸道病原体感染的辅助诊断。

呼吸道感染（Respiratory tract infection, RTI）是人类最常见的一类疾病，可在任何性别、年龄和地域中发生，大多数的呼吸道感染是由病毒、衣原体或支原体引起的，这些病原体种类繁多，且引起的临床症状和体征都比较相似，其临床表现主要为鼻炎、咽炎、喉炎、扁桃体炎等症状，严重的可引起气管炎、支气管炎及肺炎等，但不同病原体引起的感染，其治疗方法、疗效和病程也不尽相同。

流行性感病毒（Influenza virus）属于正粘病毒科（Orthomyxoviridae），为单股、负链、分节段 RNA 病毒，根据核蛋白和基质蛋白不同，分为甲（A）、乙（B）、丙（C）、丁（D）四型，是引起急性呼吸道传染病的病原体之一，主要通过空气中的飞沫、易感者与感染者之间的接触或与被污染物品的接触而传播，一般秋冬季节是其高发期。目前感染人的主要是甲型流感病毒（Influenza A virus, FluA）中的 H1N1、H3N2 亚型（其中的 H 和 N 分别代表流感病毒两种表面糖蛋白）及乙型流感病毒（Influenza B virus, FluB）中的 Victoria 系和 Yamagata 系。临床表现为发热、乏力、干咳、头痛、肌痛、咽喉痛等症状。感染乙型流感的儿童常以呕吐、腹痛、腹泻为主要表现。

腺病毒（Adenovirus, Adv）是一种没有包膜的直径为 70~90 nm 的双链 DNA 病毒。腺病毒对呼吸道、胃肠道、尿道和膀胱、眼、肝脏等均可感染，其中呼吸道疾病主要由 HAdV-B、HAdV-C 和 HAdV-E 引起。呼吸道感染的典型症状是咳嗽、鼻塞和咽炎，同时伴有发热、寒战、头痛和肌肉痛等症状，严重时可引起肺炎。

呼吸道合胞病毒（Respiratory syncytial virus, RSV），是一种 RNA 病毒，是引起小儿病毒性肺炎最常见的病原，多见于 3 岁以下的婴幼儿，主要症状有高热、鼻炎、咽炎及喉炎，以后表现为细支气管炎及肺炎，少数患儿可并发中耳炎、胸膜炎及心肌炎等。成人和年长儿童感染后，主要表现为上呼吸道感染。RSV 分成 A、B 两个亚型，其主要差异在于病毒外膜表面的 F 蛋白和 G 蛋白的抗原性不同。

百日咳鲍特菌（Bordetella Pertussis, BP）属于鲍特菌属，为革兰氏阴性短小球杆菌。人是百日咳鲍特菌的唯一感染宿主，任何年龄的人都可以感染百日咳，其传播途径为飞沫传播，传染性极强。典型百日咳的潜伏期 2d~21d，一般为 7d~10d。百日咳的病程较长，临床可分为前驱期、痉咳期和恢复期。前驱期约持续 1~2 周，为上呼吸道感染征象，临如：低热、流涕、结膜充血、流泪及轻咳，上述症状渐轻，而咳嗽

日渐加重，进入痉咳期；痉咳期约持续 2~6 周或更长，突出表现为阵发性，痉挛性咳嗽；恢复期约持续 2~3 周，痉咳次数减少，病情减轻，最终消失。常见并发症有肺炎、肺气肿，百日咳脑病和肺结核恶化。

肺炎支原体（*Mycoplasma pneumoniae*, MP）是人类支原体肺炎的最主要病原体，主要经飞沫传染，潜伏期 2~3 周，发病率以青少年最高。临床症状较轻，甚至根本无症状，若有也只是头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状，但也有个别死亡报道。

目前针对呼吸道病原体的检测通常是基于对病原体特定的糖类蛋白质和核酸基因进行检测。常见的检测技术包括：培养法、抗原直接检测、血清学抗体检测和分子诊断等。

【检验原理】

本试剂盒以待检测病原体的保守序列为靶序列，设计特异性 PCR 扩增引物及 Taqman 探针，采用一步法 RT-PCR 对目标靶点进行扩增和实时荧光检测并绘制出扩增曲线，根据扩增曲线的 Ct 值判断样本的阴阳性。试剂盒设计了内参及外标质控品（阳性、阴性质控品）对检测过程进行质量控制。内参采用人核糖核酸酶 P（Ribonuclease P, RNaseP）基因设计引物探针，通过检测样本中内参监测待测样本质量、提取及荧光 PCR 过程。阴性质控品为 HEK293 细胞，阳性质控品为含甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病毒目的基因的假病毒和含百日咳鲍特菌、肺炎支原体目的基因的质粒及 HEK293 细胞，用于监测提取及荧光 PCR 过程。同时引入 dUTP/UDG 防污染系统，以保障检测过程的准确性。

本产品依托微流控技术，在配套芯片（泵液芯片模块，以下简称“芯片”）上实现从样本到结果的一站式操作。只需将试剂、试剂架和芯片放入仪器的指定位置，将待测样本加入芯片的加样孔中，点击鼠标加载运行程序，仪器就可以实现核酸提取纯化、PCR、荧光采集及结果判读。

【主要组成成分】

组分	名称	装量 (X 测试/盒)		数量	成分
		12	4		
试剂盒 I	扩增反应液	300 μ L	160 μ L	1 管	缓冲液、dNTPs、Taq 酶、UDG 酶、逆转录酶
	引物液 A	100 μ L	45 μ L	1 管	甲型流感病毒、乙型流感病毒、百日咳鲍特菌和内参 4 个靶标的引物和探针
	引物液 B	100 μ L	45 μ L	1 管	腺病毒、呼吸道合胞病毒、肺炎支原体和内参 4 个靶标的引物和探针
	Carrier RNA	82 μ L	33 μ L	1 管	Carrier RNA
	蛋白酶 K	190 μ L	100 μ L	1 管	蛋白酶 K
	阳性质控品	220 μ L	220 μ L	1 管	含六个目标靶点基因的假病毒(质粒)和 HEK293 细胞
	阴性质控品	350 μ L	350 μ L	1 管	HEK293 细胞
试剂盒 II	磁珠	440 μ L	200 μ L	1 管	磁珠
	润洗液	1mL	500 μ L	1 管	BSA
	洗脱液	1mL	500 μ L	1 管	Tris、EDTA
试剂盒 III	硅油	1.2 mL	1.0 mL	1 管	硅油
	裂解液 C	3mL	1.5 mL	1 管	异硫氰酸胍、十二烷基肌氨酸钠、二硫苏糖醇
	异丙醇	3mL	1.5 mL	1 管	异丙醇
	漂洗液 1A	3mL	1.5 mL	1 管	盐酸胍、异丙醇
	漂洗液 2A	3mL	1.5 mL	1 管	乙醇

备注：1. 不同规格或批次的试剂盒组分不得混用。

2. 需要但未提供的材料和设备：200 μ L 移液器及配套枪头，博晖微流控仪器配套芯片(货号：130000102)和枪头。

【储存条件及有效期】

试剂盒 I 在-15 $^{\circ}$ C以下保存，试剂盒 II 在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存，试剂盒 III 在 10 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C保存；试剂盒有效期为 12 个月。

试剂盒 I 干冰运输，开箱温度不高于-15 $^{\circ}$ C；试剂盒 II 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C运输；试剂盒 III 10 $^{\circ}$ C~30 $^{\circ}$ C运输；运输时间不超过 7 天。

试剂盒 I 反复冻融 \leq 6 次。

生产日期和使用期限见盒签或瓶签。

【适用仪器】

北京博晖创新生物技术集团股份有限公司生产的全自动核酸检测分析系统（型号 BHQ-III），软件版本号 V1。

【样本要求】

1. 样本类型

咽拭子。

2. 样本采集

2.1 采集器材

口咽采集专用无菌拭子，拭子头材质推荐采用尼龙植绒材质。拭子杆选择塑料类材质。

2.2 采样方法

按照常规咽拭子采集方法进行采集，请患者坐下，头后倾，张大嘴，采样者用压舌板固定舌头，用采样拭子越过舌根到咽后壁及扁桃体隐窝、侧壁等处擦拭，收集粘膜细胞，然后轻轻取出拭子，避免触及舌头、悬垂体，并迅速放入装有采样液的采样管中，最后在靠近采样管顶端处折断并弃去尾部，旋紧管盖。

或按照《国家流感中心标准操作规程》中关于咽拭子的采集方法进行采集。

2.3 采样液要求

推荐使用：

序号	保存液名称	装量	生产厂家	备案号
1	病毒采样试剂盒	3.5mL	友康生物科技（北京）股份有限公司	京械注准 20182400236
2	细胞保存液	3mL	宁波海尔施基因科技有限公司	浙甬械备 20190062 号
3	样本保存液	3mL	北京博晖创新生物技术集团股份有限公司	京昌械备 20200077 号

3. 样本保存

采集的待测样本可立即用于检测，如不能立即检测，可在 2 $^{\circ}$ C~8 $^{\circ}$ C保存 48 h，-20 $^{\circ}$ C保存 12 个月以内，-70 $^{\circ}$ C及以下保存 24 个月以内，应避免反复冻融，冻融次数不超过 5 次。

【检验方法】

1. 实验前准备

1.1 样本准备

将采样管置于涡旋混匀仪上充分涡旋 10 秒，冻存样本需提前室温解冻。

1.2 仪器和试剂准备

打开全自动核酸检测分析系统（按照仪器说明书操作）；

将试剂盒 I 和试剂盒 II 分别从冰箱中取出，待各组分充分平衡至室温后混匀，将管壁上残留试剂甩至管底，然后将各试剂组分置于仪器试剂架上对应位置，并放置足够的合适大小的枪头。

2. 实验操作

2.1 将混匀的样本、阴阳性质控使用移液器各取 200 μ L，加入芯片加样孔，然后将芯片装载到仪器上。

2.2 打开软件，勾选样本通道，点击加载实验，运行呼吸道病原体六重核酸测试试剂盒（PCR-荧光探针法）操作程序。

核酸提取程序运行基本过程如下所示，所有试剂组分加液过程均由仪器自动完成。

核酸提取	细胞裂解与核酸提取 纯化	加样枪分 180 μ L 裂解液到试剂池
		加样枪分别吸取一定量的裂解液（12 测试：304 μ L；4 测试：122 μ L）和蛋白酶 K（12 测试：150 μ L；4 测试：61 μ L）加入到 Carrier RNA 管，并混合
		加样枪分配上步中的混合液（包括裂解液 20 μ L、蛋白酶 K 10 μ L 和 Carrier RNA 5.5 μ L）到芯片试剂池，然后泵液到样本池
		加样枪分配 30 μ L 磁珠到试剂池，然后泵液到样本池
		加样枪分配 170 μ L 异丙醇到试剂池，然后泵液到样本池
		仪器自动进行磁珠捕获
		加样枪分配 80 μ L 漂洗液 1A 到试剂池，然后进行漂洗
		加样枪分配 80 μ L 漂洗液 2A 到试剂池，然后进行漂洗
		加样枪分配 60 μ L 润洗液到洗脱池，然后进行沟道漂洗
	洗脱核酸	加样枪分配 60 μ L 洗脱液到洗脱池，然后进行核酸洗脱
	PCR 试剂混合进样	加样枪分别吸取一定量的扩增反应液（12 测试：125 μ L；4 测试：56.3 μ L）加入到引物液 A 管和引物液 B 管，并混匀，形成扩增反应液 A 和扩增反应液 B
		PCR 管 1 和 PCR 管 2 中分别加入扩增反应液 A 和扩增反应液 B，各 13.5 μ L（其中包含扩增反应液 7.5 μ L 和引物 6 μ L）
		通过气泵向 PCR 管 1 和 PCR 管 2 中分别泵入等量的核酸 16.5 μ L
PCR 管 1 和 PCR 管 2 用硅油 30 μ L 密封		

PCR 扩增程序如下所示：

温度	时间	循环数
55 $^{\circ}$ C	6min	1
95 $^{\circ}$ C	30s	1
95 $^{\circ}$ C	10s	45
58 $^{\circ}$ C（荧光采集）	30s	

2.3 实验结束，将试剂管架上试剂瓶和芯片卸载，清洁仪器工作台。

【阳性判断值】

阳性判断值通过对临床阴性和阳性样本的检测数据采用受试者工作特征曲线（receiver operating characteristic curve, ROC）法计算得到。当某一病原体的 Ct 值小于或等于其阳性判断值时，判断该病原体为阳性；相反，则判断该病原体检测为阴性。本试剂盒各病原体及内参 Ct 值的阳性判断值为 40。

本试剂盒的判读软件中已经整合了各病原体的阳性判断值，检测结果由软件进行判读。

【检验结果的解释】

1. 样本检测结果

样本的检测结果由软件判读，结果显示在“检测信息”窗口中。例如，甲型流感病毒阳性样本的检测结果显示为“甲型流感病毒阳性，乙型流感病毒阴性，百日咳鲍特菌阴性，腺病毒阴性，呼吸道合胞病毒阴性，肺炎支原体阴性，内参阳性”。阴性样本的检测结果显示为“甲型流感病毒阴性，乙型流感病毒阴性，百日咳鲍特菌阴性，腺病毒阴性，呼吸道合胞病毒阴性，肺炎支原体阴性，内参阳性”。无效的检测结果显示为“甲型流感病毒阴性，乙型流感病毒阴性，百日咳鲍特菌阴性，腺病毒阴性，呼吸道合胞病毒阴性，肺炎支原体阴性，内参阴性”。检测无效的样本应查找原因并重复检测该样本，若检测结果还是无效，建议重新采集样本后继续检测。

检测通道	对应靶标	
	引物液 A	引物液 B
FAM	FluA	Adv
ROX	FluB	RSV
CY5	BP	MP
VIC	内参	

1) 阴性样本的判读

各个病原体靶标阴性（Ct 值大于 40，或无 Ct），引物液 A、引物液 B 中内参阳性（Ct ≤ 40），结果判定为阴性；若各个病原体靶标阴性（Ct 值大于 40，或无 Ct），引物液 A、引物液 B 中内参仅 1 个阳性或 2 个都是阴性，则判定为检测结果无效，需查找原因并重新检测或重新采样后检测。

阴性样本结果示例如下：

阴性结果 1	引物液 A	引物液 B
FAM	—	—
VIC	+	+
ROX	—	—
CY5	—	—
软件显示	各个病原体阴性，内参阳性，检测结果：阴性	

阴性结果 2	引物液 A	引物液 B
FAM	—	—
VIC	+	—
ROX	—	—
CY5	—	—
软件显示	各个病原体阴性，内参异常，检测结果：无效	

2) 阳性样本的判读

引物液 A、引物液 B 中内参阳性，任一病原体阳性则判为对应病原体阳性。若引物液 A、引物液 B 中内参仅 1 个阳性，另一管内有病原体阳性，则判为对应病原体阳性，若另一管内参阴性且病原体也是阴性，

则判为检测结果无效，需查找原因并重新检测或重新采样后检测。阳性样本结果示例如下：

阳性结果 1	引物液 A	引物液 B
FAM	—	—
VIC	+	+
ROX	+	—
CY5	—	—
软件显示	对应病原体阳性，内参阳性，检测结果：乙型流感病毒阳性	

阳性结果 2	引物液 A	引物液 B
FAM	—	—
VIC	+	—
ROX	+	—
CY5	—	—
软件显示	对应病原体阳性，内参异常，检测结果：无效	

阳性结果 3	引物液 A	引物液 B
FAM	—	—
VIC	+	—
ROX	—	+
CY5	—	—
软件显示	对应病原体阳性，内参阳性，检测结果：呼吸道合胞病毒阳性	

阳性结果 4	引物液 A	引物液 B
FAM	—	—
VIC	—	—
ROX	+	+
CY5	—	—
软件显示	对应病原体阳性，内参阴性，检测结果：乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒阳性	

2. 质量控制

(1) 阳性质控品：结果为甲型流感病毒、乙型流感病毒、腺病毒、呼吸道合胞病毒、百日咳鲍特菌及肺炎支原体阳性、内参阳性。各病原体 Ct 值介于 25-35，内参 Ct 值介于 24-33 之间。

(2) 阴性质控品：结果为六个病原体阴性、内参阳性。各病原体 Ct > 40 或 NoCt，内参 Ct 值介于 24-33 之间。

(3) 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。临床诊断和治疗需要结合临床症状、病史、其他实验室检测指标等综合考虑。
2. 检测靶序列的变异（扩增引物位置的变异、探针位置的变异）会导致假阴性结果。
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。
4. 样本中病毒滴度过低、核酸降解等均有可能导致无效检测或假阴性结果；
5. 未经验证的其它干扰因素，如未经验证的其他干扰物或 PCR 抑制因子等会导致假阴性结果。
6. 接种减毒活疫苗的患者可能会导致检测试剂检测结果呈阳性。
7. 待检核酸序列可能长时间出现在体内，而与病毒活性无关。核酸检测阳性并不一定意味着目前感染了相应病毒或其为临床症状的致病因子。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒检测第二代甲乙型流感病毒核酸检测试剂国家参考品，均符合要求。
2. 检测限：

序号	病原体	拷贝浓度/滴度浓度	序号	病原体	拷贝浓度/滴度浓度
1	FluA	2000 Copies/mL 3.20 TCID ₅₀ /mL	4	Adv	2000 Copies/mL 0.93 TCID ₅₀ /mL
2	FluB	2000 Copies/mL 7.66 TCID ₅₀ /mL	5	RSV	2000 Copies/mL 0.82 TCID ₅₀ /mL
3	B.P	2000 Copies/mL 107.48 CFU/mL	6	M.P	2000 Copies/mL

3. 阳性/阴性符合率：检测企业阳性参考品 20 份（RTI-PC01~20）、阴性参考品 10 份（RTI-NC01~10），符合率均为 100%。
4. 分析特异性：本试剂盒与以下病原体无交叉反应。

副流感 1 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	副流感 2 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	副流感 3 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	副流感 4 1.0E5 TCID ₅₀ /mL
肠道病毒 EV71 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	EB 病毒 1.0E6 copies/mL	人巨细胞病毒 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	肺炎衣原体 1.0E5 TCID ₅₀ /mL
鼻病毒 A30 型 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	人偏肺病毒 A2 型 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	博卡病毒 1.0E7 copies/mL	流感嗜血杆菌 1.0E6 cfu/mL
金黄色葡萄球菌 1.0E6 cfu/mL	肺炎链球菌 14 型 1.0E6 cfu/mL	白念珠菌 1.0E6 cfu/mL	嗜肺军团菌 1.0E6 cfu/mL
干乳酸杆菌 1.0E6 cfu/mL	副百日咳博德特氏菌 1.0E6 cfu/mL	表皮葡萄球菌 1.0E6 cfu/mL	肺炎克雷伯菌 1.0E6 cfu/mL
卡他莫拉菌 1.0E6 cfu/mL	唾液链球菌 1.0E6 cfu/mL	棒状杆菌属 1.0E6 cfu/mL	化脓性链球菌 1.0E6 cfu/mL
星状诺卡氏菌 1.0E6 cfu/mL	黏质沙雷氏菌 1.0E6 cfu/mL	柠檬酸杆菌属 1.0E6 cfu/mL	新型隐球酵母 1.0E6 cfu/mL
大肠埃希氏菌	鲍曼不动杆菌	绿脓假单胞菌	洋葱伯克霍尔德氏菌

1.0E6 cfu/mL	1.0E6 cfu/mL	1.0E6 cfu/mL	1.0E6 cfu/mL
纹带棒杆菌 1.0E6 cfu/mL	嗜麦芽窄食单胞菌 1.0E6 cfu/mL	胺胍罗斯氏菌 1.0E6 cfu/mL	烟曲霉 1.0E6 cfu/mL
黄曲霉 1.0E6 cfu/mL	脑膜炎奈瑟菌 1.0E6 cfu/mL	口腔链球菌 1.0E6 cfu/mL	单纯疱疹病毒 I 型 1.0E6 TCID ₅₀ /mL
水痘带状疱疹病毒 1.0E5 TCID ₅₀ /mL	脑膜炎奈瑟菌 1.0E6 cfu/mL	肺孢子菌 1.0E6 cfu/mL	

5. 干扰试验：选取鼻咽中潜在的干扰物质（主要有血液、鼻腔分泌物或粘液、鼻和咽喉中用于缓解鼻塞、鼻腔干燥、刺激或哮喘和过敏症状的药物，以及抗生素和抗病毒药物等）29种，使用单阳临界阳性水平及混合阳性临界水平样本进行检测。结果表明，内源物质 2.5% (w/v) 粘蛋白、2%全血及高浓度人体细胞（10⁶ 个/mL，内参）不影响检测结果。采样过程中可能引入的干扰物质：15% (v/v) 羟甲唑啉、50mg/L 地塞米松、100mg/mL 曲安奈德、320mg/L 布地奈德、10mg/mL 孟鲁司特纳、50mg/L 金刚烷胺、7.5mg/L 利巴韦林、7.5mg/L 奥司他韦、10mg/mL 左氧氟沙星、10mg/mL 诺氟沙星、30%漱口水、500mg/L 莫匹罗星、1% (v/v) NaCl、1.7mg/mL 薄荷脑、100mg/L 妥布霉素、10mg/mL 盐酸非索非那定、150mg/L 莫米松、100μg/mL 苯福林、250μg/mL 倍氯美松、10μg/mL 氟尼缩松、250μg/mL 氟替卡松、50μg/mL 盐酸组胺、50μg/mL 苯佐卡因、100μg/mL 扎那米韦、100μg/mL 帕拉米韦，不会影响检测结果的判定。50μg/mL 冻干鼻喷流感减毒疫苗有可能会影响甲型流感病毒和乙型流感病毒的检出，对于使用鼻喷流感减毒疫苗的患者，有可能会出现甲型流感病毒和乙型流感病毒假阳性。
6. 精密度：本研究用于精密度评价的样本包含3个水平，阴性样本、临界阳性样本和中阳性样本，其中临界阳和中阳样本是用阴性样本稀释配置成临阳和中阳两个浓度（即 2×LoD 和 20×LoD）。重复性和室内精密度评价试验模型为 20×2，实验室间精密度评价本次试验模型为 3×5×5。产品的重复性精密度、室内精密度、再现性精密度和批间精密度 CV 均≤5%，满足产品技术要求。
7. 临床试验结果：本试剂盒临床研究共入组 2150 例有效病例，使用同类已上市产品、测序法及培养作为对比方法，其中甲型流感病毒阳性符合率 98.1%，95%置信区间为（95.6%，99.2%），阴性符合率 99.3%，95%置信区间为（98.8%，99.6%），总符合率：99.2%，95%置信区间为（98.7%，99.5%）；乙型流感病毒阳性符合率 100.0%，95%置信区间为（98.2%，100.0%），阴性符合率 99.5%，95%置信区间为（99.1%，99.8%），总符合率 99.6%，95%置信区间为（99.2%，99.8%）；腺病毒阳性符合率 96.4%，95%置信区间为（93.5%，98.0%），阴性符合率 99.7%，95%置信区间为（99.4%，99.9%），总符合率 99.3%，95%置信区间为（98.9%，99.6%）；呼吸道合胞病毒阳性符合率 99.6%，95%置信区间为（97.5%，99.9%），阴性符合率 99.2%，95%置信区间为（98.7%，99.5%），总符合率 99.3%，95%置信区间为（98.8%，99.5%）；肺炎支原体阳性符合率 98.8%，95%置信区间为（96.5%，99.6%），阴性符合率 99.3%，95%置信区间为（98.8%，99.6%），总符合率 99.2%，95%置信区间为（98.7%，99.5%）；百日咳鲍特菌

阳性符合率 99.7%，95%置信区间为（98.4%，99.9%），阴性符合率：99.8%，95%置信区间为（99.5%，99.9%），总符合率 99.8%。95%置信区间为（99.5%，99.9%）。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。
2. 本产品仅针对样本要求项中说明的适用样本类型及样本采集、处理方法，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。
3. 由于 Taqman 荧光 PCR 方法本身的局限性等因素，可能会产生非典型扩增曲线，导致假阳性；如出现该情况建议对该样本进行复检。
4. 试剂、样本使用前要完全解冻并混匀，应尽量避免反复冻融。
5. 检测芯片使用前请确保八联排 PCR 管与芯片贴合得紧密无缝，如有松动现象应人工安装紧固后再使用；注意轻拿轻放，放置到仪器上时请保证八联排 PCR 管置于仪器上的加热模块内。芯片开封后如暂时不用，请放置于干燥环境内，并尽快使用。
6. 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书全文，并严格按操作步骤执行；不使用本试剂盒提供的组分或不按照说明书进行实验将可能导致错误结果。
7. 仪器使用时需关闭仪器舱门，操作者穿工作服和一次性手套，万一试剂与皮肤、粘膜接触，请立即用自来水冲洗。
8. 临床样本应被视为潜在传染源，应按照相应的生物安全规范操作处理，在样本采集和处理过程中需注意防护，并符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
9. 每次实验前后对全自动核酸检测分析系统进行清洁，实验前使用 84 消毒液，用无尘布沾液进行表面擦拭，过程中不要碰触气路板和硅橡胶垫片，结合紫外照射破坏残留核酸，降低污染；实验后使用 84 消毒液，用无尘布沾液进行表面擦拭。必要时用 DNA 去除剂进行清洁擦拭。

【标识的解释】

IVD 体外诊断医疗器械

【参考文献】

1. 中华人民共和国国家卫生健康委员会.流行性感 冒诊疗方案（2019 年版）
2. 中华人民共和国国家卫生健康委员会.百日咳诊断标准（WS 274-2007）

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京博晖创新生物技术集团股份有限公司

住所：北京市昌平区生命园路 9 号院

邮编：

电话：

传真：

售后服务单位名称：

客户服务电话：

生产地址：北京市昌平区生命园路9号院

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期/生效日期及修改日期】