

受理号：CSZ1900198

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：呼吸道病原菌核酸检测试剂盒
(恒温扩增芯片法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：百康芯（天津）生物科技有限公司

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.....	5
三、 临床评价概述.....	13
四、 产品受益风险判定.....	15
综合评价意见.....	17

基本信息

一、申请人名称

百康芯（天津）生物科技有限公司

二、申请人住所

天津市武清商务区畅源道国际企业社区 C4 号楼 1-3 层

三、生产地址

天津市武清商务区畅源道国际企业社区 C4 号楼 1-3 层

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

产品由试剂盒 A、试剂盒 B 组成，主要组成成分见表 1。

表 1 主要组成成分

组成	组分名称	主要组分	规格	数量
试剂盒 A	芯片	引物	1 人份/片	12 片
试剂盒 B	恒温扩增试剂	荧光染料、酶、dNTPs	420 μ L/管	1 管
	阳性对照品	7 种阳性菌核酸	105 μ L/管	1 管
	阴性对照品	1 \times TE	105 μ L/管	1 管

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于定性检测有呼吸道症状的住院患者痰液中 7 种临床常见下呼吸道病原菌，包括：耐甲氧西林葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌。

样本类型是从疑似下呼吸道感染的住院患者痰液提取的核酸。本试剂盒适用于有呼吸道症状的住院患者的下呼吸道感染的辅助诊断。

(三) 产品包装规格

12 人份/盒。

(四) 产品检验原理

环介导恒温扩增法 (Loop-mediated Isothermal

Amplification, LAMP) 的原理是针对靶序列的 6 个区域设计 4 条特异引物 (包括 2 条内引物和 2 条外引物), 利用具备链置换功能的 DNA 聚合酶在恒定温度 (65℃左右) 下不断复制扩增 DNA, 其反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长和再循环阶段, 最终形成茎环结构和多环花椰菜样结构的 DNA 片段混合物。通常还在反应体系中添加两条环引物, 使之分别与茎环结构结合, 启动链置换合成, 循环复制, 提高反应效率。

本试剂盒在恒温扩增反应体系中加入荧光染料, 利用荧光染料掺入法进行实时荧光检测。阳性样本扩增检测时会产生“S”形实时荧光扩增曲线, 一步完成对靶基因的扩增和检测。该检测技术与微流控芯片技术相结合, 可同时对多种核酸靶基因进行并行扩增检测。每张芯片上设有 10 个反应池, 依次编号 1-10 号。每张芯片在特定反应池包埋固定一套引物用于其对应核酸靶序列的扩增与检测。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

本产品的主要原材料包括: 引物、酶、dNTPs、荧光染料、对照品和芯片底片。这些原材料均为外购方式获得。引物为申请人自行设计后由专业的合成公司合成。芯片底片为申请人自主研发、外协加工。

申请人选择有资质的供应商提供的原料, 通过功能性试

验，筛选出最佳原材料和供应商，制定了各主要原材料的质量标准并经检验合格。

试剂盒在企业内部产品放行之前使用企业参考品进行最终放行检测，参考品采用临床分离株和标准菌株制备而成，包含阴性参考品、阳性参考品、最低检出限参考品和重复性参考品。阴性参考品为乙酸钙不动杆菌、屎肠球菌、奇异变形杆菌、琼氏不动杆菌、阴沟肠杆菌和摩氏摩根菌的混合菌液。阳性参考品的成分为试剂盒覆盖的 7 种阳性病原菌，由 7 种单菌株和 4 种混合菌株组成。最低检出限参考品的成分为试剂盒覆盖的 7 种阳性病原菌，由 7 种单菌株和 3 种混合菌株组成。重复性参考品为试剂盒覆盖的 7 种阳性病原菌的混合菌液。试剂盒检测结果符合质控标准后才可放行使用。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人通过对试剂主要生产工艺的研究，确定了最佳生产工艺。

申请人对引物浓度、酶浓度、dNTPs 浓度、荧光染料浓度、BSA 浓度、Betaine 浓度、 Mg^{2+} 浓度、UNG 酶浓度、dUTP 浓度以及恒温扩增条件等进行筛选和优化，并通过验证最终确定了最佳反应体系。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能评估内容主要包括：核酸提取效率、阴

/阳性符合率、最低检出限、包容性、交叉反应、干扰试验、重复性、方法学比对等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品在适用机型 iChip-400 恒温核酸扩增分析仪上的性能评估资料。

在核酸提取效率中，比较评估了产品配套使用的核酸提取试剂盒的提取效果，结果表明配套使用的核酸提取试剂盒的核酸提取效率满足产品使用需求。

在阴/阳性符合率中，申请人采用三批成品试剂盒，检测企业阳性参考品和阴性参考品。结果表明阳性符合率和阴性符合率均为 100%。

在最低检出限研究中，申请人采用三批成品试剂盒，检测系列浓度梯度样本，将达到 95%阳性检出率的最低浓度水平作为确定的最低检出限，并进行最低检出限验证。结果表明：耐甲氧西林葡萄球菌（20 种型别）、金黄色葡萄球菌（1 种型别）、大肠埃希氏菌（4 种型别）、肺炎克雷伯菌（3 种型别）、铜绿假单胞菌（5 种型别）、鲍曼不动杆菌（2 种型别）和嗜麦芽窄食单胞菌（4 种型别）的最低检出限为 5×10^2 CFU/ μ L；确定耐甲氧西林葡萄球菌（2 种型别）、大肠埃希氏菌（3 种型别）、鲍曼不动杆菌（2 种型别）的最低检出限为 2.5×10^2 CFU/ μ L；大肠埃希氏菌（18 种型别）最低检出限为 1×10^2 CFU/ μ L。由于本试剂盒对各病原体的检测并不是分型检测，所以选择该病原体不同型别检出限浓度中

的最高浓度作为该指标的最低检出限浓度，最终确定该产品的最低检出限为 5×10^2 CFU/ μ L。

在包容性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对标准菌株及不同型别的病原体进行检测。包括耐甲氧西林葡萄球菌的 22 种型别（Sccmec type I、SCCmec Type II、Sccmec type III、SCCmec type IV、SCCmec V、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、耐甲氧西林溶血葡萄球菌、耐甲氧西林腐生葡萄球菌、耐甲氧西林人葡萄球菌、耐甲氧西林施氏葡萄球菌、耐甲氧西林木糖葡萄球菌、耐甲氧西林松鼠葡萄球菌、耐甲氧西林山羊葡萄球菌、耐甲氧西林孔氏葡萄球菌、耐甲氧西林模仿葡萄球菌、耐甲氧西林克氏葡萄球菌、耐甲氧西林缓慢葡萄球菌、耐甲氧西林沃氏葡萄球菌、耐甲氧西林中间型葡萄球菌、耐甲氧西林耳葡萄球菌、耐甲氧西林解糖葡萄球菌）、肺炎克雷伯菌的 3 个亚种（鼻硬结亚种、肺炎亚种、臭鼻亚种）、金黄色葡萄球菌金黄色亚种、大肠埃希氏菌的 25 种型别（出血性大肠埃希氏菌 0157:H7、肠致病性大肠埃希氏菌 0157、肠侵袭性大肠埃希氏菌、致泻大肠埃希氏菌 086:K61、产肠毒素大肠埃希氏菌 025:K19、产肠毒素大肠埃希氏菌 078:K80、志贺毒性大肠埃希氏菌、肠道集聚性大肠埃希氏菌、致病性大肠埃希氏菌 026:K60、致泻大肠埃希氏菌 0127:K63、产肠毒素大肠埃希氏菌 0126:K71、产肠毒素大肠埃希氏菌 08:K40、肠侵袭性

大肠埃希氏菌 028ac:K73、致泻大肠埃希氏菌 044:K74、致泻大肠埃希氏菌 055:K59、出血性大肠埃希氏菌 0111:H8、肠侵袭性大肠埃希氏菌 0112ac:K66、肠侵袭性大肠埃希氏菌 0124:K72、致泻大肠埃希氏菌 0125:K70、致泻大肠埃希氏菌 0128:K67、致泻大肠埃希氏菌 0114:K90、致泻大肠埃希氏菌 0119:K69、肠侵袭性大肠埃希氏菌 0136:K78、产肠毒素大肠埃希氏菌 06:K15、致泻大肠埃希氏菌 0142:K86)、铜绿假单胞菌的 5 种型别 (G 型、B 型、L 型、F 型、E 型)、鲍曼不动杆菌的 4 种型别 (ST195 型、ST457 型、ST92 型、ST75 型) 和嗜麦芽窄食单胞菌的 4 种型别 (ST31 型、ST4 型、ST25 型、ST29 型)。结果表明试剂盒对标准菌株及不同型别的病原体均能正确检出, 说明试剂盒包容性良好。

在交叉反应研究中, 申请人采用三批成品试剂盒, 分别进行了近源菌交叉反应、不在试剂盒检测范围中的呼吸道感染相关病原体的交叉反应。结果表明: 本试剂盒与近源菌(表皮葡萄球菌、人形葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、科氏葡萄球菌科氏亚种、头葡萄球菌头亚种、沃氏葡萄球菌、伤口埃希氏菌、赫氏埃希氏菌、蟑螂埃希氏菌、产酸克雷伯氏菌、土生克雷伯氏菌、产气克雷伯氏菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、琼氏不动杆菌、乙酸钙不动杆菌、洛菲不动杆菌、嗜根寡养单胞菌、嗜酸寡养单胞菌、还原亚硝酸盐寡养单胞菌) 不存在交叉, 与其他呼吸道病原体(腺病

毒、人副流感 2 型病毒、人副流感 3 型病毒、呼吸道合胞病毒 A 型、人冠状病毒 HCoV-OC43、人冠状病毒 HCoV-HKU1、人冠状病毒 HCoV-229E、人冠状病毒 HCoV-NL63、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体、百日咳杆菌、白色念珠菌、肺炎衣原体、肺孢子菌、棒状杆菌属、化脓性链球菌、流感嗜血杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、唾液链球菌、卡他莫拉菌、脑膜炎奈瑟菌）无交叉反应。

在干扰试验中，申请人采用三批成品试剂盒，对样本中可能含有的人基因组 DNA（33ng/μL）、人全血（30%）、黏蛋白（2.5mg/mL）、阿奇霉素（8μg/mL）、头孢克肟（9μg/mL）、抗生素（6ng/mL 莫匹罗星）、抗病毒药物（426ng/mL 扎那米韦、60mg/mL 利巴韦林、7.5mg/mL 奥司他韦、0.2mg/mL 帕拉米韦）、鼻喷雾剂（0.3mg/mL 苯福林、25ng/mL 羟甲唑林、0.45%氯化钠）进行研究，结果表明：低于上述浓度的内源/外源性物质，不会对本产品的检测结果产生干扰。对微生物（乙酸钙不动杆菌、屎肠球菌、奇异变形杆菌、琼氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、摩氏摩根菌、肺炎链球菌）进行研究，结果表明：上述微生物不会对本产品的检测结果产生干扰。另外，申请人对正常人和非呼吸系统疾病患者的痰液样本进行检测，确定通过严格控制阳性判断值，可以较大程度上排除呼吸道定植菌对本试剂盒的潜在干扰，本试剂盒采用痰液检测不会对疾病的诊断造成误导。

在重复性研究中，申请人采用三批成品试剂盒，对阴性、强阳、中阳和弱阳性共 4 个浓度样本分别进行连续 21 天的重复性检测，评估了批内/批间、日内/日间、不同地点、不同仪器以及不同操作者之间的精密度。结果表明：本试剂盒的批间/批内、日间/日内重复性良好，且不同操作人员和不同仪器对试剂盒的检测没有影响。

在方法学比对研究中，申请人分别用本试剂盒和已上市同类试剂盒对收集的阳性样本进行检测。结果表明：两种试剂盒对收集的阳性临床样本检测结果一致性良好。

本次申报产品仅包括 1 种包装规格（12 人份/盒），1 种适用机型，申请人提供了三批产品在适用机型上的性能评估资料。

（四）阳性判断值研究

申请人采用本产品和配套仪器对收集的临床样本进行检测，获得的原始 T_p 值用于制定各指标的阳性判断值。对于含有阳性和阴性数据的指标，采用 ROC 曲线法制定各指标的阳性判断值。并进行了阳性判断值的验证，根据验证结果最终确定了试剂盒的阳性判断值见表 2。

表 2 阳性判断值

检测指标	阳性判断值
耐甲氧西林葡萄球菌	19.25
金黄色葡萄球菌	35.75
大肠埃希氏菌	28.00
肺炎克雷伯菌	26.00

检测指标	阳性判断值
铜绿假单胞菌	16.75
鲍曼不动杆菌	27.00
嗜麦芽窄食单胞菌	15.25

(五) 稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、运输稳定性、开瓶稳定性、反复冻融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。

实时稳定性：试剂盒 A 保存于 2~8℃，试剂盒 B 保存于 -20±3℃。分别于不同时间点领取完整包装的试剂盒，对其外观、阴阳性符合率、最低检出限、重复性进行考察。结果表明：试剂盒 A 在 2~8℃ 条件下，试剂盒 B 在 -20±3℃ 条件下，本试剂盒的有效期为 10 个月。

运输稳定性：申请人对成品试剂盒进行实际运输，运输方式为冷链运输，在试剂盒规定的储存温度进行运输。分别于产品运输前、运输返回公司后、及储存至 11 个月时，领取完整包装的试剂盒，对其外观、阴阳性符合率、最低检出限、重复性进行考察。结果表明：试剂盒在规定条件下运输，不会影响试剂盒的外观和性能指标。

开瓶稳定性及冻融稳定性：申请人对成品试剂盒按照规定存储温度进行存储，将试剂盒 B 冻结后再取出置于室温解冻，如此反复冻融数次。将冻融后的产品在不同时间点进行外观、阴阳性符合率、最低检出限、重复性的考察。结果表

明，试剂开封后不影响试剂盒有效期，使用过程中尽量避免反复冻融，冻融次数不超过 13 次。

申请人对样本保存稳定性以及样本冻融次数进行了研究。结果显示：未提取核酸的痰液样本和提取后的核酸样本在 10 ~ 30℃ 条件下保存时间不得超过 12h；在 2 ~ 8℃ 条件下保存时间不得超过 7 天；在 -20 ± 3 ℃ 条件下保存时间不得超过 3 个月，尽量避免反复冻融。

三、临床评价概述

申请人在中国医学科学院北京协和医院、首都医科大学附属北京儿童医院、福建省立医院共三家临床试验机构完成了临床试验，入组病例分为两部分，分别为疑似或确诊的下呼吸道感染住院患者的痰液样本 1180 例及非呼吸道感染患者痰液样本 503 例，共计入组了 1683 例患者痰液样本，采用申报产品与测序法（大肠埃希氏菌指标）及已上市同类产品（其余 6 个指标）为对比方法的比对研究，验证本产品的临床性能，对检测结果不一致的样本用测序法进行复核。

疑似或确诊的下呼吸道感染住院患者这部分的试验结果显示，针对耐甲氧西林葡萄球菌，申报产品与对比试剂的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 98.17%、99.51% 和 99.32%，Kappa 值为 0.97；针对金黄色葡萄球菌，申报产品与对比试剂的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 99.36%、98.92% 和 98.98%，Kappa 值为 0.96；针对肺炎克雷

伯菌，申报产品与对比试剂的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 98.82%、99.60%和 99.49%，Kappa 值为 0.98；针对铜绿假单胞菌，申报产品与对比试剂的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 97.86%、99.50%和 99.24%，Kappa 值为 0.97；针对鲍曼不动杆菌，申报产品与对比试剂的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 98.48%、99.69%和 99.49%，Kappa 值为 0.98；针对嗜麦芽窄食单胞菌，申报产品与对比试剂的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 100.00%、99.91%和 99.92%，Kappa 值为 0.99；针对大肠埃希氏菌，申报产品与测序法的阳性符合率、阴性符合率和总符合率分别为 99.01%、99.91%和 99.83%，Kappa 值为 0.99。其中，共检出 284 例混合感染样本，结果表明，与测序法的阳性符合率大于 98%，阴性符合率、总符合率均大于 99%，与对比试剂的阳性符合率均大于 97%，阴性符合率均大于 98%、总符合率均大于 98%。以上结果表明，申报产品与对比试剂及对比方法等效。同时，还进行了 1063 例申报产品检测结果和培养结果的比对分析，统计结果显示，各指标阳性符合率均大于 96%，阴性符合率均大于 89%，总符合率均大于 89%，表明申报产品与培养鉴定结果具有较高的一致性。对于检测结果不一致的样本，均进一步进行了测序复核，并对结果进行了分析和解释。

非呼吸道感染患者这部分的试验结果显示，申报产品与

对比试剂/对比方法各指标阳性符合率均达到了 95.00%以上，阴性符合率及总符合率均达到了 95.00%以上，Kappa 值均大于 0.75。以上结果表明，申报产品与对比试剂及对比方法等效。503 例样本中，包含住院患者痰液样本 296 例，总阳性率为 11.5%，门诊患者为 207 例，总阳性率为 10.1%。

综上所述，该产品临床试验资料对产品的临床性能进行了较全面的研究，临床试验符合要求。

四、产品受益风险判定

参照“YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械的应用”标准，对该产品进行风险分析。经综合评价，呼吸道病原菌核酸测试剂盒（恒温扩增芯片法）已知和可预见的安全风险主要有以下几个方面：

1. 与生物学危害有关的安全风险，例如原料之间的交叉污染；
2. 与预期用途有关的安全风险，例如超预期用途使用；
3. 与运输与储存有关的安全风险，例如试剂运输与储存的条件超出可接受范围；
4. 与使用有关的安全风险，例如使用时没有按照说明书要求进行操作；
5. 与生产有关的安全风险，例如原料供应商稳定性及原材料采购周期；

6. 与环境有关的危害，例如废弃物或医疗器械处置的污染等。

通过环境控制、生产监控、原材料管理、成品检验和增加说明书警示内容等防范措施，对该产品已知和可预见的安全风险进行控制和降低，剩余风险可以被控制在验收准则规定的可接受范围内，同时没有带来新的危害与安全风险，在目前认知水平上，认为该产品上市带来的获益/受益大于风险。

尽管目前认为该产品的受益大于风险，但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在产品说明书中提示以下信息：

1. 适用范围：本试剂盒用于定性检测有呼吸道症状的住院患者痰液中 7 种临床常见下呼吸道病原菌，包括：耐甲氧西林葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌。样本类型是从疑似下呼吸道感染的住院患者痰液提取的核酸。本试剂盒适用于有呼吸道症状的住院患者的下呼吸道感染辅助诊断。

2. 警示及注意事项：产品说明书中介绍了该产品检验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医疗器械产品注册。属于优先审批项目（编号：20190018）。申请人的注册申报资料符合现行要求，依据《医疗器械监督管理条例》（国务院令第680号）、《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2014年第5号）等相关医疗器械法规与配套规章，经系统评价后，建议准予注册。

2021年06月25日

附件：产品说明书

呼吸道病原菌核酸检测试剂盒（恒温扩增芯片法）说明书

【产品名称】

通用名称：呼吸道病原菌核酸检测试剂盒（恒温扩增芯片法）

【包装规格】

12人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测有呼吸道症状的住院患者痰液中7种临床常见下呼吸道病原菌，包括：耐甲氧西林葡萄球菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、肺炎克雷伯菌、铜绿假单胞菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌。

样本类型是从疑似下呼吸道感染的住院患者痰液提取的核酸。本试剂盒适用于有呼吸道症状的住院患者的下呼吸道感染的辅助诊断。

下呼吸道感染仍是我国临床上最常见的疾病之一，其中绝大多数为细菌性下呼吸道感染。世界卫生组织 2016 年发布的统计结果显示，世界十大死因中下呼吸道感染（6.1%）位列第三位，位列第四位的慢性阻塞性肺病（5.8%）死亡也多和感染相关。临床常规的生化指标分析无法对患者所感染的病原菌种属做出准确鉴定，大多数临床治疗仍处于经验抗菌素应用阶段，在使用高级抗生素方面存在较大的盲目性。目前临床上主要使用的鉴定病原菌的方法是细菌培养法。

国内研究结果显示，医院感染病原菌以革兰阴性菌为主。医院获得性肺炎（hospital-acquired pneumonia, HAP）与呼吸机相关性肺炎（ventilator-associated pneumonia, VAP）是我国最常见的医院获得性感染。2018 年发布的《中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南》表明，我国 HAP/VAP 患者常见的细菌为鲍曼不动杆菌、铜绿假单胞菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、大肠埃希菌、阴沟肠杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌。院内感染的发生率较高，给患者和医院造成很大负担。住院患者发生院内感染的原因有以下几个方面：首先，基础疾病本身导致机体免疫功能低下，抗感染能力降低；其次，基础疾病发生或治疗过程中需要卧床、进行各种注射和穿刺术，甚至留置血管导管、胸导管、导尿管，严重病例气管切开呼吸机支持治疗等各种治疗措施、破坏皮肤粘膜屏障功能，导致机体抵抗微生物入侵能力降低；第三，由于基础疾病需要长期或间断到医院进行诊治，医护人员和医患之间的交叉感染机会增加院内感染发生率；最后，随着住院患者生活、饮食习惯的变化，比如，由于身体或心理的原因，卫生习惯不良，老年患者牙齿和骨关节退化，食物种类单一导致营养素的含量减少，活动量减少等各方面因素均能够导致住院患者发生院内感染的比率明显高于平均院内感染率。大量调查发现，在临床工作中，院内感染的发生率与其预防、控制和治疗具有密切关系。因此，建立有效的医院感染监控体系是降低院内感染，提高医疗水平，减轻患者痛苦及经济负担的重要手段。

【检验原理】

环介导恒温扩增法（Loop-mediated Isothermal Amplification, LAMP）的原理是针对靶序列的6个区域设计4条特异引物（包括2条内引物和2条外引物），利用具备链置换功能的DNA聚合酶在恒定温度（65℃左右）下不断复制扩增DNA，其反应过程包括哑铃状模板合成阶段、循环扩增阶段、伸长和再循环阶段，最终形成茎环结构和多环花椰菜样结构的DNA片段混合物。通常还在反应体系中添加两条环引物，使之分别与茎环结构结合，启动链置换合成，循环复制，提高反应效率。

本试剂盒在恒温扩增反应体系中加入荧光染料，利用荧光染料掺入法进行实时荧光检测。阳性样本扩增检测时会产生“S”形实时荧光扩增曲线，一步完成对靶基因的扩增和检测。该检测技术与微流控芯片技术相结合，可同时对多种核酸靶基因进行并行扩增检测。芯片结构详见图1：每张芯片上设有10个反应池，依次编号1-10号。每张芯片在特定反应池包埋固定一套引物用于其对应核酸靶序列的扩增与检测，每个反应池对应的检测指标信息详见表1。

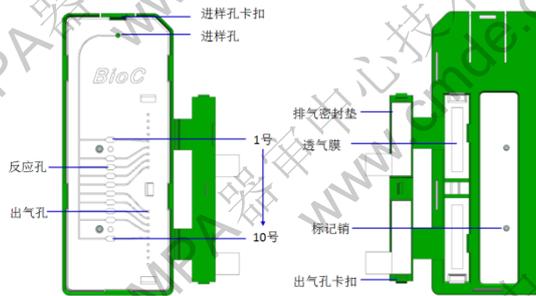


图1 微流控芯片结构图

表1 芯片反应池对应检测指标

反应池	检测指标
1	阳性质控
2	阴性质控 1
3	耐甲氧西林葡萄球菌
4	金黄色葡萄球菌
5	大肠埃希氏菌
6	肺炎克雷伯菌
7	铜绿假单胞菌
8	鲍曼不动杆菌
9	嗜麦芽窄食单胞菌
10	阴性质控 2

【主要组成成分】

表 2 试剂盒组成

组成	组分名称	主要组分	规格	数量
试剂盒 A	芯片	引物	1 人份/片	12 片
试剂盒 B	恒温扩增试剂	荧光染料、酶、dNTPs	420 μ L/管	1 管
	阳性对照品	7 种阳性菌核酸	105 μ L/管	1 管
	阴性对照品	1 \times TE	105 μ L/管	1 管

注：不同批号试剂盒中各组分不可以混用。
 需要但未提供：百康芯（天津）生物科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：津械备 20170148 号）或成都博奥晶芯生物科技有限公司生产的核酸提取试剂（备案号：川蓉械备 20160034 号）。

【储存条件及有效期】

试剂盒A于2C°~8C°避光保存，试剂盒B于-20C°±3C°避光保存，有效期为10个月。

使用过程中尽量避免反复冻融，冻融次数不超过13次。

【适用仪器】

本试剂盒适用于百康芯（天津）生物科技有限公司生产的iChip-400恒温核酸扩增分析仪。

【样本要求】

1. 样本类型
 样本来源于住院病例，采集疑似下呼吸道感染患者的痰液。
2. 样本保存
 提取的核酸建议立即检测，若不能立即检测，-20C°保存不超过三个月，且应避免反复冻融。
3. 样本运输
 样本的短期运输应采用冰壶、泡沫箱加冰或干冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本收集

痰液样本具体采集方法如下：以晨痰为佳。咳痰前，患者用清水漱口，用力咳出气管深部痰于无菌痰液收集器内，勿留取唾液和鼻咽腔分泌物，痰液量应不少于 0.6mL；取痰液做涂片镜检，质量要求如下：痰涂片在低倍物镜下检测 20 个~ 40 个视野，白细胞>25 个/低倍视野且上皮细胞<10 个/低倍视野。如无镜检结果，则核酸检测结果无效。

2. 实验前准备

根据实验需求，准备相应数量的试剂盒。

提示：1、痰液样本预处理及核酸提取要求在生物安全柜内进行，扩增反应准备操作要求在洁净工作台内进行，开始前先将生物安全柜与洁净工作台分别用 75%乙醇擦拭干净，再紫外灭菌 15 分钟。
2、灭菌时切勿将芯片置于紫外光照射范围内，以免破坏引物结构。

3. 仪器和材料要求

- > iChip-400 恒温核酸扩增分析仪
- > 涡旋振荡仪
- > 高速离心机
- > 微量移液器（规格：20~200 μ L）
- > 移液器吸头（要求洁净无菌吸头，规格：20~200 μ L）
- > 离心管（要求洁净无菌，规格：200 μ L、1.5mL）
- > 各种规格的离心管架

4. 样本提取

核酸提取建议采用百康芯（天津）生物科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：津械备 20170148 号）或成都博奥晶芯生物科技有限公司生产的核酸提取试剂（备案号：川蓉械备 20160034 号）。痰液的液化处理方法：加入痰液样本 4 倍体积的 4% NaOH（用户自备），充分震荡混匀，于室温放置 30 分钟，使其充分液化，当无固态及拉丝状为液化完全。

5. 芯片加样

5.1 配制恒温扩增反应体系

从试剂盒中取出恒温扩增试剂平衡至常温，涡旋振荡混匀后瞬时离心。
 在试剂储存和准备区，吸取35 μ L恒温扩增试剂加入准备好的200 μ L离心管中，盖好管盖后移至标本制备区，每份样本使用1个离心管。
 在标本制备区，加入35 μ L被检核酸样本（或者对照品），涡旋振荡混匀后瞬时离心。每份核酸扩增反应体系总体积为70 μ L（表3）。

表 3. 恒温扩增反应体系

反应组分	体积(μL)
恒温扩增试剂	35.0
模板 DNA 溶液	35.0
共计	70.0

5.2 芯片加样

在标本制备区，从试剂盒中取出芯片使其平衡至常温；在洁净工作区内打开包装并将芯片进出样口向上，用移液器吸取69μL上述配制好的核酸扩增反应体系，从进样孔加入到芯片主通道中，待其充满整张芯片通道，并能感觉到明显加样阻力时即停止加样，分别压紧进样孔与出气孔的卡扣。

**提示：1、进出样口较小，加样前请确认已将吸头牢固插入进样口以免漏液。
2、确认卡扣全部卡到位。**

6. 核酸扩增及结果判读

6.1 核酸扩增

6.1.1 先打开 iChip-400 恒温核酸扩增分析仪电源，然后打开电脑桌面上的“iChip-400”软件，点击主界面的“检测”按钮进入检测界面，等待右上角从“未连接”转变为“就绪”。

6.1.2 打开仪器上盖，将芯片分别插入芯片检测通道中。

6.1.3 点击“检测设置”按钮，在对应通道录入待检样本的信息。录入完成后勾选相对应通道，然后点击操作区域的“启动”按钮开始样本检测，仪器将按照预设参数（见表4）进行样本检测，在“实时荧光曲线”区域显示实时荧光曲线，在“检测状态信息”区域显示剩余时间。检测完成后，软件将自动进行数据分析，同时仪器将自动进行降温处理，待提示“检测完成”后将芯片取出。

表 4. 核酸扩增反应参数

步骤	温度 (C°)	时间 (min)
1	37	3
2	65	47

6.2 结果判读

检测完成后，检测仪器自带软件对结果进行分析处理，采用二阶导数法计算出“S”型扩增曲线进入快速扩增期的第一个拐点，拐点对应的时刻与原点的差值定义为 Tp 值 (Time of Positive)，根据 Tp 值并结合阳性判断值进行结果判读。

判读完成后，在“荧光曲线区域”显示归一化曲线，在“检测结果”区域显示质控结果和各检测指标的检测结果。

【阳性判断值】

本试剂盒采用受试者工作特征 (ROC) 曲线分析得到 7 种待检指标的阳性判断值。当检测指标的 Tp 值小于或等于该指标的阳性判断值时，判读为阳性；当检测指标的 Tp 值大于该指标的阳性判断值时，判读为阴性。

各指标的阳性判断值如下：

检测指标	阳性判断值
耐甲氧西林葡萄球菌	19.25
金黄色葡萄球菌	35.75
大肠埃希氏菌	28.00
肺炎克雷伯菌	26.00
铜绿假单胞菌	16.75
鲍曼不动杆菌	27.00
嗜麦芽窄食单胞菌	15.25

【检验结果的解释】

1. 芯片内阳性质控和阴性质控

本试剂盒的每张芯片内均设有1个阳性质控和2个阴性质控。其中，阳性质控检测结果应为阳性，阴性质控1在检测阳性对照品或企业参考品时起到阴性质控作用，在检测含有人细胞的临床样本时还起到内质控作用；阴性质控2为空白质控。

图2为样本正常扩增结果图，图片右侧为结果显示区域，质控正常，表明本次检验结果有效。

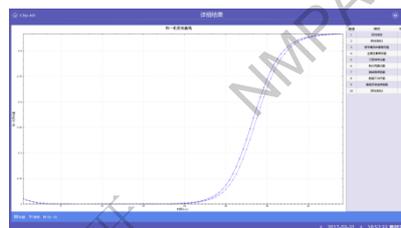


图2 正常扩增结果图

图3为样本异常扩增结果图。若任一质控异常，判定本次样本检验结果无效，需要对样本进行复检，若复检后仍为异常，需重新采集样本进行检测。

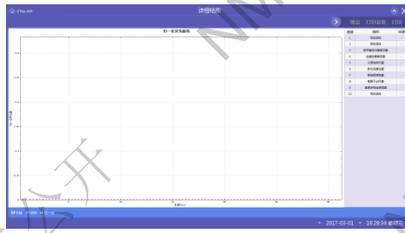


图3异常扩增结果图

2. 试剂盒对照品

阳性对照品检测结果：质控正常，且7种检测指标均应为阳性

阴性对照品检测结果：质控正常，且7种检测指标均应为阴性。

当对操作环境洁净度存疑时，可使用阴性对照品及阳性对照品进行质控。

3. 结果判读说明

对于有效检测结果，如图2，界面右侧列表中检测结果“+”表明样本中检测到该细菌且T_p值小于或等于对应阳性判断值，检测报告单中会提示该细菌阳性；

对于有效检测结果，如图2，界面右侧列表中检测结果“-”表明样本中未检测到该细菌或T_p值大于对应阳性判断值，检测报告单中会提示该细菌阴性；

对于无效检测结果，如图3，检测报告单中会提示质控异常。需要进行复检，若复检后，质控结果仍为异常，需重新采集样本进行检测。

其中，关于金黄色葡萄球菌两个检测指标的结果解释如下表5：

表 5. 金黄色葡萄球菌结果解释

		耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (mecA)	
		“+”	
金黄色葡萄球菌	“+”	可能为耐甲氧西林金黄色葡萄球菌 (MRSA)*	可能为甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌 (MSSA)
	“-”	未检测到金黄色葡萄球菌	

*注：本产品中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌指标由 mecA 基因指示，该耐药基因理论上不能排除为其他菌所携带。

【检验方法的局限性】

本试剂盒仅用于痰液提取的核酸检测。

本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

本试剂盒检测对象为常见下呼吸道病原菌，共计7种，并未涵盖与下呼吸道感染相关的全部细菌，且不含与下呼吸道感染相关的病毒及真菌。因此，报告的下呼吸道病原菌种类仅限于本试剂盒所检测的菌种，检测结果阴性不代表样本未含有其它病原体。

本试剂盒中耐甲氧西林金黄色葡萄球菌指标由mecA基因指示，耐甲氧西林金黄色葡萄球菌基因检测结果仅能覆盖耐药机制为mecA基因的耐药结果，但是小部分MRSA不携带mecA，存在其它耐药机制，可能出现漏检。

【产品性能指标】

1. 阳性符合率：该试剂盒对指标涵盖的7种（11株）呼吸道阳性病原菌检测结果均正确。
2. 阴性符合率：该试剂盒对6种临床常见呼吸道近源菌（乙酸钙不动杆菌、屎肠球菌、奇异变形杆菌、琼氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、摩氏摩根菌）进行检测，检测结果均无交叉反应；试剂盒指标涵盖的7种呼吸道病原菌之间无交叉反应。
3. 最低检出限：该试剂盒对7种呼吸道阳性病原菌最低检出限为 5×10^2 CFU/ μ L。
4. 重复性：对阴性、强阳、中阳和弱阳性样本分别进行连续21天的重复性检测，结果表明批内/批间、日内/日间、不同地点、不同仪器以及不同操作者之间的重复性良好。
5. 抗干扰能力：人痰液自身对试剂盒检测结果无影响；当待测样本中分别含有33ng/ μ L以内的人基因组DNA、30%以下浓度的人全血、2.5mg/mL以内的黏蛋白、8 μ g/mL以内的阿奇霉素、9 μ g/mL以内的头孢克肟、6ng/mL以内的莫匹罗星、426ng/mL以内的扎那米韦、60mg/mL以内的利巴韦林、7.5mg/mL以内的奥司他韦、0.2mg/mL以内的帕拉米韦、0.3mg/mL以内的苯福林、25ng/mL以内的羟甲唑啉A型、0.45%以内的氯化钠以及其它微生物（乙酸钙不动杆菌、屎肠球菌、奇异变形杆菌、琼氏不动杆菌、阴沟肠杆菌、摩氏摩根菌、肺炎链球菌）时，不会对试剂盒检测结果造成明显影响。
6. 交叉反应：该试剂盒与覆盖的病原体的近源菌（表皮葡萄球菌、人形葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、科氏葡萄球菌科氏亚种、头葡萄球菌头亚种、沃氏葡萄球菌、伤口埃希氏菌、赫氏埃希氏菌、蟑螂埃希氏菌、产酸克雷伯氏菌、土生克雷伯氏菌、产气克雷伯氏菌、施氏假单胞菌、恶臭假单胞菌、荧光假单胞菌、琼氏不动杆菌、乙酸钙不动杆菌、洛非不动杆菌、嗜根养单胞菌、嗜酸养单胞菌、还原亚硝酸盐养单胞菌）不存在交叉，试剂盒中肺炎克雷伯菌和栖异地克雷伯菌之间会存在交叉，大肠埃希氏菌和志贺菌之间会存在交叉。但是目前报道的栖异地克雷伯菌来源主要是血液和尿液，志贺菌主要在肠道中，而本试剂盒的样本类型为痰液样本，所以用本试剂盒检测到志贺菌和栖异地克雷伯菌的可能性不大；该试剂盒与其他呼吸道病原体（腺病毒、人副流感2型病毒、人副流感3型病毒、呼吸道合胞病毒A型、人冠状病毒HCoV-OC43、人冠状病毒HCoV-HKU1、人冠状病毒HCoV-229E、人冠状病毒HCoV-NL63、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎支原体、百日咳杆菌、白色念珠菌、肺炎衣原体、肺炎球菌、棒状杆菌属、化脓性链球菌、流感嗜血杆菌、嗜酸乳杆菌、嗜肺军团菌、结核分枝杆菌、唾液链球菌、卡他莫拉菌、脑膜炎奈瑟菌）无交叉反应。
7. 包容性：该试剂盒可检出耐甲氧西林金黄色葡萄球菌的22种亚型（SCCmec type I、SCCmec type II、SCCmec type III、SCCmec type IV、SCCmec V、耐甲氧西林金黄色葡萄球菌、耐甲氧西林表皮葡萄球菌、耐甲氧西林溶血葡萄球菌、耐甲氧西林腐生葡萄球菌、耐甲氧西林人葡萄球菌、耐甲氧西林施氏葡萄球菌、耐甲氧西林木糖葡萄球菌、耐甲氧西林松鼠葡萄球菌、耐甲氧西林山羊葡萄球菌、耐甲氧西林孔氏葡萄球菌、耐甲氧西林模仿葡萄球菌、耐甲氧西林克氏葡萄球菌、耐甲氧西林缓慢葡萄球菌、耐甲氧西林沃氏葡萄球菌、耐甲氧西林中间型葡萄球菌、耐甲氧西林耳葡萄球菌、耐甲氧西林解糖葡萄球菌）、肺炎克雷伯菌的3个亚种（鼻硬结亚种、肺炎亚种、臭鼻亚种）、金黄色葡萄球菌金黄色亚种、

大肠埃希氏菌的 25 种型别（出血性大肠埃希氏菌 O157:H7、肠致病性大肠埃希氏菌 O157、肠侵袭性大肠埃希氏菌、致泻大肠埃希氏菌 O86:K61、产肠毒素大肠埃希氏菌 O25:K19、产肠毒素大肠埃希氏菌 O78:K80、志贺毒性大肠埃希氏菌、肠道集聚性大肠埃希氏菌、致病性大肠埃希氏菌 O26:K60、致泻大肠埃希氏菌 O127:K63、产肠毒素大肠埃希氏菌 O126:K71、产肠毒素大肠埃希氏菌 O8:K40、肠侵袭性大肠埃希氏菌 O28ac:K73、致泻大肠埃希氏菌 O44:K74、致泻大肠埃希氏菌 O55:K59、出血性大肠埃希氏菌 O111:H8、肠侵袭性大肠埃希氏菌 O112ac:K66、肠侵袭性大肠埃希氏菌 O124:K72、致泻大肠埃希氏菌 O125:K70、致泻大肠埃希氏菌 O128:K67、致泻大肠埃希氏菌 O114:K90、致泻大肠埃希氏菌 O119:K69、肠侵袭性大肠埃希氏菌 O136:K78、产肠毒素大肠埃希氏菌 O6:K15、致泻大肠埃希氏菌 O142:K86）、铜绿假单胞菌的 5 种型别（G 型、B 型、L 型、F 型、E 型）、鲍曼不动杆菌的 4 种型别（ST195 型、ST457 型、ST92 型、ST75 型）和嗜麦芽窄食单胞菌的 4 种型别（ST31 型、ST4 型、ST25 型、ST29 型）。

8. 临床试验：本试剂盒在三家临床医院进行了以测序法（大肠埃希氏菌指标）及对比试剂（其余 6 个指标）为对比方法的比对研究，共完成了 1683 例痰液样本的临床试验。其中 1180 例为疑似或确诊的下呼吸道感染住院患者痰液样本的临床试验。本部分结果表明，与测序法的阳性符合率、阴性符合率、总符合率均大于 99%，与对比试剂的阳性符合率均大于 97%、阴性符合率均大于 98%、总符合率均大于 98%。其中，共检出 284 例混合感染样本，结果表明，与测序法的阳性符合率大于 98%，阴性符合率、总符合率均大于 99%，与对比试剂的阳性符合率均大于 97%、阴性符合率均大于 98%、总符合率均大于 98%。另外，还统计了 1063 例临床样本的考核试剂检测结果和培养结果，各指标阳性符合率均大于 96%、阴性符合率均大于 89%、总符合率均大于 89%。此外，本临床还完成了 503 例非呼吸道感染患者痰液样本的临床试验，其中住院患者为 296 例，总阳性率为 11.5%，门诊患者为 207 例，总阳性率为 10.1%。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。
2. 操作致病菌 DNA 应在规定的实验场所进行，穿戴防护衣物、一次性手套、口罩；所有直接接触过细菌的物品应严格消毒后再次使用或销毁。
3. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检测实验室的管理规范执行。
4. 操作人员必须经过培训，合格后方可上岗。
5. 使用前，液体试剂应混合均匀，尽量避免反复冻融；开封后的恒温扩增试剂一定要避光-20±3℃保存。
6. 所使用的接触核酸扩增试剂的材料均要求洁净无菌。
7. 芯片为一次性使用，如果发现芯片开封前铝箔袋包装有破损，请勿使用。
8. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换使用，请勿使用过期试剂。
9. 根据《中华人民共和国药典》2015 年版二部，常温系指 10℃~30℃。

【标识的解释】

标签上的 **IVD** 标识代表体外诊断试剂。

【参考文献】

1. Huang GL, et al. Sensitive sequence-specific molecular identification system comprising an aluminum micro-nanofluidic chip and associated real-time confocal detector. *Analytica Chimica Acta*, 2011, 695: 1-10.
2. Kang Y, et al. Etiologic diagnosis of lower respiratory tract bacterial infections using sputum samples and quantitative loop-mediated isothermal amplification. *PLoS ONE*, 2012, 7(6): e38743 1-12.
3. 陈瑜生等. 环介导等温扩增技术在下呼吸道感染常见病原体检测中的应用, *中华结核和呼吸杂志*, 2014, 37(4): 270-273.
4. 杨滢, 方旭, 卯升曼, 等. 某综合医院住院患者医院感染和社区感染现患率调查[J]. *中国消毒学杂志*, 2017, 34(10): 981-984.
5. 姜婷叶, 常清利, 张磊, 等. 医院感染主要致病革兰阴性杆菌分布及耐药性分析[J]. *中国医药*, 2019(11).
6. 中华医学会呼吸病学分会感染学组. 中国成人医院获得性肺炎与呼吸机相关性肺炎诊断和治疗指南(2018年版) [J]. *中华结核和呼吸杂志*, 2018, 41(4): 255-280.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：百康芯（天津）生物科技有限公司
住所：天津市武清商务区畅源道国际企业社区 C4 号楼 1-3 层
电话：022-82939595
网址：<http://www.bai-care.com>
售后服务单位名称：百康芯（天津）生物科技有限公司
电邮：support@bai-care.com
电话：400-898-0905
生产地址：天津市武清商务区畅源道国际企业社区 C4 号楼 1-3 层
生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】