

呼吸道合胞病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)说明书

【产品名称】

通用名称：呼吸道合胞病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】24 人份 / 盒

【预期用途】

本产品用于定性检测人口咽拭子样本中的呼吸道合胞病毒核酸。

呼吸道合胞病毒 (Respiratory Syncytial Virus, RSV) 是呼吸道感染的常见起因，婴幼儿尤其易感，患者常有发烧及头痛、食欲减退、身体感到痛楚或软弱无力等症状，可通过直接与患者的分泌物、飞沫接触，或间接与受污染的手、餐具，或受患者鼻分泌物感染的物件接触进行传播，每年 3 月~9 月为传播高发期。

【检验原理】

本产品采用荧光 PCR 技术，选取呼吸道合胞病毒基因组中相对保守的区域，设计特异性引物及探针，在样本核酸提取之后采用荧光 PCR 方法，对临床样本中呼吸道合胞病毒进行快速定性检测。

本产品采用磁珠法提取呼吸道合胞病毒 RNA 模板，先在逆转录酶的作用下反转录成 cDNA,然后在 Taq 酶的作用下对靶区域进行扩增，同时利用 Taqman 荧光探针技术实时监测扩增产物的累积。同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

【主要组成成分】

包装	组分	主要成分
核酸提取试剂	磁珠	磁珠
	核酸提取液 1	氯化钠、乙二醇四乙酸、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、十二烷基硫酸钠、异硫氰酸胍
	核酸提取液 2	β-巯基乙醇、氯化钠
	核酸提取液 3	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、无水乙醇
	核酸提取液 4	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	核酸提取液 5	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、乙二醇四乙酸
	核酸助沉剂	核酸助沉剂
扩增试剂	RSV PCR 反应液	尿嘧啶-N- 糖基化酶、反转录酶、TaqDNA 聚合酶、脱氧核糖核苷三磷酸、氯化镁、两对引物、两条荧光探针
	RSV 阳性质控品	RSV 阳性质粒片段
	RSV 弱阳性质控品	RSV 阳性质粒片段

	RSV 阴性质控品	灭菌水
	RSV 内标	内标阳性质粒的溶液
	蛋白酶 K	蛋白酶 K 溶液

注 1：不同批次产品之间同一组分不可以相互替换。

注 2：试剂盒以外必需的设备及材料：荧光定量 PCR 仪、漩涡振荡器、生物安全柜、迷你离心机、干式恒温仪或水浴锅、移液器及灭菌的吸头(带过滤塞无 RNase)、1.5ml 灭菌离心管(RNase-Free)、离心机、PCR 八连管(荧光 PCR 专用)、无粉乳胶手套和磁力架。

注 3：内标模板与靶基因无同源性。

注 4：蛋白酶 K 属于提取组分，但应冷冻保存，所以放在扩增试剂盒中。

【储存条件及有效期】

核酸提取试剂在 2~8℃ 保存，扩增试剂在-20±5℃ 保存，有效期 8 个月。

试剂盒应避光保存，避免重压、反复冻融。

产品生产日期见标签，失效日期见标签。

开盖稳定性：开盖后请于 2 个月内使用。

冻融稳定性：试剂盒冻融 3 次内，试剂盒性能稳定不影响使用。

运输稳定性要求：采用干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，到货后按照-20±5℃ 条件下保存，产品可稳

定保存至产品效期末。

【适用仪器】适用于 ABI 7500、Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 适用样本类型：口咽拭子。
- 口咽拭子采集：

点燃酒精灯，嘱病人张口暴露咽喉，用培养管内的消毒长棉签以灵敏而轻柔的动作擦拭两侧腭弓和咽、扁桃体上的分泌物。取毕，将试管口在酒精灯火焰上消毒，然后将棉签插入试管(含 0.4ml 无菌生理盐水)中，塞紧，密闭送检。
- 样本保存：样本收集后可立即用于检测。2~8℃ 条件下保存不超过 24 小时。-20℃ 条件下可保存 8 个月。长期保存请置于-70℃ 条件以下。应避免反复冻融。
- 运输：运输过程中应采用不易碎的容器装载样本，并且视作潜在的传染源，避免外漏。采用冰壶或

干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，避免样本运输途中解冻，影响检测结果。

5.提取核酸的要求:提取产物浓度范围应为 10ng/μl~100ng/μl; OD260/OD280 的比值在 1.7~1.9 之间。

【检验方法】

1.样本处理

1.1 实验开始前取出试剂盒所需组分，轻微振荡，使其充分混匀，如试剂中有沉淀，请溶解后使用。操作时，如发现管壁和管盖有液体，请短暂离心使液体甩入管底，再置于磁力架上。

1.2 取 N 个 1.5ml 灭菌离心管（N 为所需提取临床样本的数量），分别加入 300μl 提取液 1、40μl 蛋白酶 K、4μl 核酸助沉剂、20μl 磁珠（使用前充分振荡混匀），200μl 待处理样本，100μl 提取液 2，室温颠倒混匀 15 分钟，使磁珠和核酸充分结合。

1.3 将离心管放在磁力架上静置 2 分钟，磁珠吸附完全，溶液澄清后弃去上清液。吸附在离心管盖上的磁珠可通过反复颠倒磁力架冲洗下来。

1.4 加入 550μl 提取液 3，漩涡振荡使磁珠重新悬浮，然后置于磁力架上，2 分钟磁分离后去上清。

1.5 重复操作 1.4。

1.6 将离心管放置在磁力架上，缓慢加入 600μl 提取液 4，吹吸 3 次，静置 2 分钟磁分离后弃去上清液，取下离心管。

1.7 加入 50μl 提取液 5，用移液器缓慢吹打混匀，55℃温浴 10 分钟，期间轻轻晃动溶液两次。

1.8 将离心管放在磁力架上静置 2 分钟，磁分离后将上清液转移至新的灭菌离心管中。

2.试剂配制

2.1 配制说明

检测反应设置 RSV 阳性质控品，RSV 弱阳性质控品和 RSV 阴性质控品。

2.2 配制过程

提前 30 分钟将试剂取出，室温融化，涡旋振荡 10 秒，2000 rpm 离心 15 秒待用。确定反应数 N，N=待检样本数(n)+质控品数(3)。计算加到反应混合液中的各个试剂的量，计算如下表：

试剂	RSV PCR 反应液	内标模板
体积（μl）	19×N	1×N

取 1.5 ml 离心管(灭菌)配制反应体系，试剂全部加入后，涡旋振荡 10 秒，2000 rpm 离心 15 秒待用。然后将上述混合液 20 μl/管分装至 PCR 反应管中(荧光 PCR 用)。

3.加样

将已处理样本、RSV 阳性质控品，RSV 弱阳性质控品和 RSV 阴性质控品各 5μl 分别加入 PCR 反应管中，盖紧管盖(避免气泡产生)，2000 rpm 离心 15 秒，将管壁上的液体全部甩至管底，然后立即进行

PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增程序设置

4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

1) 仪器操作请参照仪器说明书。

2) 靶基因选择 FAM 通道；内标选择 VIC 通道。

3) 循环参数设置见下表：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	RNA 反转录	50℃	30 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火、延伸、荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

4.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

1) 仪器操作请参照仪器说明书。

2) 靶基因选择 FAM 通道；内标选择 HEX 通道。

3) 循环参数设置见下表：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	RNA 反转录	50℃	30 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火、延伸、荧光信号采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

5.结果分析条件设定

5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时，基线(Baseline)的起始点(Start)设定在 5~8 之间，终止点(Stop)设定在 12~15 之间，阈值线(Threshold)通常设定

在 1000~5000 之间（视具体情况而定）。设定之后，点击 “Analyze”(分析)按键，即可从“Report”窗口的“Ct”处得到各样本的 Ct 值。

5.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值，手动调整基线（Non-adaptive baseline）的起始点（Start）一般设定为 5~8，终止点（Stop）一般设定为 12~15，阈值线（Threshold fluorescence）通常设定在 500~2000 之间（视具体情况而定）。设定之后，可以从“Text report”窗口的“Ct(dRn)”处得到各样本的 Ct 值。

6.质量控制

6.1 内标：内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

6.2 阴性质控品：靶基因通道无 S 型扩增曲线；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

6.3 阳性质控品：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤30.0；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

6.4 弱阳性质控品：靶基因通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0；内标通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

以上条件必须要在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值】

本试剂盒的阳性样本参考值为 Ct 值≤37.0；阴性样本无 Ct 值；37.0<Ct 值≤40 为灰度区；内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0。

【检验结果的解释】

- 1.若内标通道没有出现 S 型扩增曲线，则需重复试验，若依旧没有出现 S 型扩增曲线，请联系生产厂家。
- 2.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道无 S 型扩增曲线，则检测样本为 RSV 阴性。
- 3.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤35.0，同时靶基因通道有 S 型扩增曲线，则有如下解释：
 - 3.1 若靶基因通道 Ct 值≤37.0，则检测样本为 RSV 阳性。
 - 3.2 若 37.0<靶基因 Ct 值≤40.0，需重新提取样本核酸进行检测，若重复检测 Ct 值≤40.0，则检测样本为 RSV 阳性。
- 4.若靶基因 Ct 值≤15.0 而又出现不规则曲线，建议重新提取样本核酸或对样本核酸进行一定梯度稀释再进行检测。具体方法见本说明书的样本处理。

【检验方法的局限性】

当检测样本被检核酸浓度含量低于最低检测限时可能会有阴性结果，阴性结果仅能说明低于本试剂盒检测限值，不能完全排除感染的可能，此时建议采用其他方法进一步确认。

【产品性能指标】

- 1.本试剂盒的最低检出限为 1.0×10^2 copies/ml。
- 2.本试剂盒验证过的呼吸道合胞病毒 A 型、B 型均能检出，但无法区分该样本的具体型别。
- 3.本试剂盒对于可能存在检测干扰的非呼吸道合胞病毒如肠道病毒、肠道病毒 71 型、肺炎支原体、鸟分枝杆菌、土地分枝杆菌、草分枝杆菌、副流感病毒、流感病毒、结核分枝杆菌、甲型流感病毒、乙型流感病毒、肺炎衣原体、腺病毒、肺炎链球菌、流感嗜血杆菌、百日咳杆菌、金黄色葡萄球菌、柯萨奇病毒 A16 型、大肠杆菌和巨细胞病毒检测结果均为阴性。
- 4.抗干扰物质：对于可能存在检测干扰的含粘蛋白、利巴韦林阳性样本，检测结果均为阳性。
- 5.阳性参考品符合率：检测企业阳性参考品（P1~P8），阳性符合率为 8/8。
- 6.阴性参考品符合率：检测企业阴性参考品（N1~N8），阴性符合率为 8/8。
- 7.精密度参考品符合率：重复检测企业精密度参考品（J1 和 J2）10 次，阳性符合率均为 10/10，Ct 值的变异系数 CV 均≤5%。
- 8.最低检出限参考品符合率：重复检测企业最低检出限参考品（L）10 次，阳性符合率为 10/10。

【注意事项】

- 1.实验前请仔细阅读本说明书。
- 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。
- 3.在生物安全柜内进行试剂和样本准备，实验中穿工作服，戴口罩和一次性手套，使用自卸管式移液器。
- 4.样本制备区内的生物安全柜、超净台、加样器、离心机及其他设备都应使用 10%次氯酸钠溶液消毒，然后用实验室三级水或 70%乙醇洗涤去除残留的次氯酸钠。
- 5.扩增试剂需-20±5℃冷冻保存，试剂使用前要完全解冻，避免反复冻融。
- 6.为使实验室工作区被扩增产物污染的可能性降到最低，实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训。
- 7.所用消耗品应保证无菌一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。对每次实验进行质量控制。移液器必须定期校准。
- 8.样本制备区所用过的吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。
- 9.工作完后必须定期对实验室采取有效的去污染措施。
- 10.不同批号试剂盒中各组分不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒，不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。
- 11.本产品仅用于体外诊断。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断器械
	参考使用说明书
	保护环境

【参考文献】

[1] TeRSVleton K E, Scheltinga S A, Beersma M F C, et al. Rapid and sensitive method using multiplex real-time PCR for diagnosis of infections by influenza A and influenza B viruses, respiratory syncytial virus, and parainfluenza viruses 1, 2, 3, and 4[J]. Journal of clinical microbiology, 2004, 42(4): 1564-1569

[2] Thonur L, Maley M, Gilray J, et al. One-step multiplex real time RT-PCR for the detection of bovine respiratory syncytial virus, bovine herpesvirus 1 and bovine parainfluenza virus 3[J]. BMC veterinary research, 2012, 8(1): 37

[3] Beck E T, Jurgens L A, Kehl S C, et al. Development of a rapid automated influenza A, influenza B, and respiratory syncytial virus A/B multiplex real-time RT-PCR assay and its use during the 2009 H1N1 swine-origin influenza virus epidemic in Milwaukee, Wisconsin[J]. The Journal of Molecular Diagnostics, 2010, 12(1): 74-81

[4] 刘恩梅, 彭才静. 呼吸道合胞病毒感染防治进展[J]. 临床儿科杂志, 2011, 29(8): 705-707

[5] 刘晓红. 呼吸道合胞病毒感染发病机制和药物治疗进展[J]. 中国临床医生, 2011, 39(3): 8-12

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

联系方式：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系方式：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

网址：www.bioresource.com.cn

生产许可证编号：京食药监械生产许 20120027 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400487

【说明书核准及修改日期】