

【产品名称】

通用名称：发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装，48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定量检测血清样本中的发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA。

本试剂盒适用于发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒感染的辅助诊断。检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

2009 年至 2010 年，湖北、山东、河南、辽宁等 6 省地蜱虫叮咬导致多人出现的“发热伴血小板综合征”病例，经中国疾病预防控制中心研究证实患者感染的是发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒（SFTSV）。SFTSV 感染临床潜伏期约为 1~2 周。急性起病，主要临床表现为发热，体温多在 38℃ 以上，重者持续高热，可达 40℃ 以上，伴乏力、明显纳差、恶心、呕吐、腹泻等消化道症状，可有单侧浅表淋巴结肿大。临床上常见血小板和白细胞减少，大多数患者很快出现多器官功能受损，表现为血清中谷丙转氨酶、谷草转氨酶、乳酸脱氢酶等水平升高，常见蛋白尿和血尿。少数病例病情危重，出现意识障碍、皮肤瘀斑、消化道出血等，可因休克、呼吸衰竭、弥漫性血管内凝血（DIC）等多脏器功能衰竭死亡。绝大多数患者预后良好，既往有基础疾病及老年患者病重症比例较高，预后较差。目前发热伴血小板减少综合征感染的主要检测方法为核酸检测法、病毒分离培养法以及血清学方法。其中发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒的核酸检测是病毒感染最直接、最敏感和特异的方法。

【检验原理】

本试剂盒利用一步法实时荧光 PCR 技术，以发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行一步法 RT-PCR 扩增，用于血清标本中发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA 的定量检测。另外，本试剂盒还带有内标物质，用于对核酸提取整个过程进行监控，减少假阴性结果的出现。

使用本试剂盒提供的核酸提取试剂对临床样本进行处理和核酸提取，以试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制成 PCR 反应管，将样本核酸加入 PCR 反应管中，使用荧光定量 PCR 仪进行一步法 RT-PCR 扩增，并检测荧光信号。仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线，根据标准曲线和阈循环值（CT 值）实现对未知样本的定量检测。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
核酸提取试剂	离心柱	48 个/包	1	/
	收集管	96 个/包	2	/
	病毒裂解液	11mL/瓶	1	胍盐
	抑制物去除液（浓缩液）	16.5mL/瓶	1	Tris-HCl 缓冲液
	去离子液（浓缩液）	11mL/瓶	1	NaCl
	洗脱液	6mL/瓶	1	DEPC H ₂ O
	蛋白酶 K（干粉）	-	2	蛋白酶 K
	Carrier RNA（干粉）	-	2	Carrier RNA
PCR 检测试剂	SFTSV PCR 反应液 A	850μL/管	1	特异性引物探针、MgCl ₂ 、Tris 盐酸 Buffer
	SFTSV PCR 反应液 B	150μL/管	1	热启动 Taq 酶、逆转录酶、RNasin
	SFTSV 内标溶液	250μL/管	1	含内标片段的病毒样颗粒及稳定剂
质控品	阴性质控品	200μL/管	1	生理盐水
	SFTSV 强阳性质控品	200μL/管	1	含 SFTSV 目的片段的病毒样颗粒
	SFTSV 临界阳性质控品	200μL/管	1	含 SFTSV 目的片段的病毒样颗粒
	SFTSV 阳性定量参考品 1(1.0×10 ⁵ TCID ₅₀ /mL)	50μL/管	1	含 SFTSV 目的片段的重组质粒
	SFTSV 阳性定量参考品 2(1.0×10 ⁴ TCID ₅₀ /mL)	50μL/管	1	含 SFTSV 目的片段的重组质粒
	SFTSV 阳性定量参考品 3(1.0×10 ³ TCID ₅₀ /mL)	50μL/管	1	含 SFTSV 目的片段的重组质粒
	SFTSV 阳性定量参考品 4(1.0×10 ² TCID ₅₀ /mL)	50μL/管	1	含 SFTSV 目的片段的重组质粒

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

核酸提取试剂组分保存于室温(18~30℃)；PCR 检测试剂、质控品组分保存于-20±5℃，避免反复冻融；有效期 6 个月。

试剂盒生产日期及失效日期见产品包装标签。

【适用仪器】

ABI 7500、ABI 7300、LightCycler480、BioRad CFX-96 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1 适用样本类型：血清。

2 标本采集：

血清 — 用无菌真空管，采集患者急性期（发病 2 周内）和恢复期（发病 4 周左右）非抗凝血 5mL，及时分离血清，分装保存于带螺旋盖、内有垫圈的冻存管内，做好标记。

采集病人标本时可进行一般性防护（穿戴口罩、手套和长袖工作服）。野外采集标本时，应穿着颜色明亮的防护服，并将衣袖或裤管口扎紧以防蜱叮咬人体。一旦发现有蜱附着体表，应当用镊子等工具夹取，不要用手直接摘除。野外作业或活动的人员可使用驱避剂喷涂皮肤。

3. 标本保存和运送：

标记清楚后将血清保存于-70℃冰箱（一周内可保存在-20℃冰箱），用于病毒核酸提取；标本运送应以干冰保持低温环境。同时注意生物安全规范和遵照有关传染性标本的运送法规。

【检验方法】

1 实验前准备

- 1.1 每瓶蛋白酶 K（干粉）中各加入 1.375mL 的洗脱液，充分混匀，溶解。 -20℃保存。
- 1.2 每管 Carrier RNA（干粉）中各加入 110μL 的 SFTSV 内标溶液，充分混匀，溶解。 -20℃保存（Carrier RNA 为白色或半透明物质，请仔细检查，确保其完全溶解）。
- 1.3 抑制物去除液（浓缩液）中加入 10mL 的无水乙醇，并在瓶盖及瓶身上打勾。室温保存。
- 1.4 每瓶去离子液（浓缩液）中各加入 44mL 的无水乙醇，并在瓶盖及瓶身上打勾。室温保存。
- 1.5 进行实验前须将病毒裂解液与 Carrier RNA 进行混合（现配现用），配置成裂解工作液。其比例见下表：

	1 人份	24 人份	48 人份
病毒裂解液	200μL	4.8mL	9.6mL
Carrier RNA	4μL	96μL	192μL

注：如将病毒裂解液、抑制物去除液不恰当地放置在低温时，可能会出现结晶沉淀。37℃温育至其消失即可；各试剂使用完后，请旋紧瓶盖。

2 核酸提取（样本制备区）

将待测样本与阴性质控品、SFTSV 强阳性质控品、SFTSV 临界阳性质控品进行同步处理。

- 2.1 在 1.5mL 的无菌离心管内加入 50μL 的蛋白酶 K；
- 2.2 取样本 200μL 加入离心管中；
- 2.3 再加入 200μL 的裂解工作液（即已含 Carrier RNA 的病毒裂解液），盖紧管盖，漩涡振荡 15 秒以充分混匀，高速离心 10 秒（防止温育时产生气泡），72℃ 10 分钟。同时可将洗脱液置于 72℃预热；
- 2.4 再加入 250μL 无水乙醇，盖紧管盖，振荡 15 秒；
- 2.5 将混合液全部吸至离心柱，室温下 12,000rpm 离心 1 分钟，将离心柱装至新的收集管；
- 2.6 将 500μL 的抑制物去除液加入离心柱，室温下 12,000rpm 离心 1 分钟，将离心柱装至新的收集管；
- 2.7 将 500μL 的去离子液加入离心柱，室温下 12,000rpm 离心 1 分钟，将离心柱装至新的收集管；
- 2.8 再次将 500μL 的去离子液加入离心柱，室温下 12,000rpm 离心 1 分钟，将离心柱装至新的收集管；
- 2.9 将离心柱-收集管于室温下 14,000rpm 离心 3 分钟以除去残余的乙醇；
- 2.10 将离心柱取出，放置于新的 1.5mL 离心管。打开离心柱盖子，72℃放置 2 分钟（使用干式恒温器，不能使用水浴锅）；
- 2.11 在离心柱的膜的正上方小心加入 72℃预热的洗脱液 35μL，盖紧离心柱管盖，室温静置 1 分钟后，14,000rpm 离心 1 分钟。离心管内即为病毒核酸溶液，建议立即使用，如需保存，置于-20℃。

3 PCR 扩增

3.1 试剂准备及加样

- 3.1.1 取适量 PCR 反应管，每管加入 SFTSV PCR 反应液 A 17μL、SFTSV PCR 反应液 B 3μL（也可根据 PCR 反应用量，计算各组分所需总量，混匀后分装 20μL 于单个 PCR 反应管中）；
- 3.1.2 于上述 PCR 反应管中分别加入处理后的阴性质控品核酸、待测标本核酸、阳性质控品核酸以及阳性定量参考品 1~4，加样量为 5μL，8,000rpm 离心数秒，放入 PCR 扩增仪。

3.2 ABI Prism 7500 仪器设置（ABI Prism 7300 仪器参照此操作，具体操作见说明书）

- 3.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: none, Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: none, Passive Reference: NONE。
- 3.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：
50℃ 15 分钟，1 个循环；95℃ 15 分钟，1 个循环；94℃ 15 秒→55℃ 45 秒（收集荧光），45 个循环。
设置完成后，保存文件，运行程序。

3.3 LightCycler480 仪器设置

- 3.3.1 点击软件主界面的“New Experiment”，进入程序设定界面。
- 3.3.2 检测模式设置：从 Detection Format 的下拉框中选择分析模式：Multi Color Hydrolysis Probe，“Customizes”模块中选择 FAM(483-533)和 VIC(523-568)滤片组合，“Block Type”为仪器自动检测，“Plate ID”可手工输入或扫描仪扫描，“Reaction Volume”设定为 50ul。
- 3.3.3 循环参数：定义 PCR 程序中每个步骤（Program Name）及循环数(Cycles)和分析模式(Analysis Mode)，利用“+”和“-”增加或删除步骤，扩增参数如下：
50℃ 15 分钟，1 个循环；95℃ 15 分钟，1 个循环；94℃ 15 秒→55℃ 45 秒，45 个循环；（此步采集荧光信号：“Analysis Mode”选择“Quantification”，“Acquisition Mode”选择“Single”）40℃ 10 秒，1 个循环；
- 3.3.4 填样品表：点击“Sample Editor”模块，进入样本信息编辑界面，在“Select Workflow”中选择“Abs Quant”，在“Sample Name”列中定义样本名称，在“Sample Type”栏中选定样品类型：阴性质控品选 NTC；未知样品选 Unknown。
- 3.3.5 运行程序：点击“Experiment”模块，回到程序设定界面，点击窗口右下方的“Start Run”，弹出结果保存窗口，输入文件名和路径后进入程序运行界面。

3.4 BioRad CFX-96 仪器设置

- 3.4.1 双击图标进入软件主界面，点击“OK”按钮进入新实验程序设定界面。
- 3.4.2 点击“protocol”模块进入循环参数设置界面，点击“Creat New.”按钮创建一个新的循环参数，然后利用左侧按钮调整扩增参数如下：

50°C 15 分钟, 1 个循环; 95°C 15 分钟, 1 个循环; 94°C 15 秒→55°C 45 秒, 45 个循环; (此步采集荧光信号: 点击“add plate read to”添加荧光采集步骤) 40°C 10 秒, 1 个循环; 设置完成后点击“OK”按钮并保存循环参数文件。

3.4.3 点击“plate”模块进入样品参数设置界面, 点击“Creat New..”按钮创建一个新的循环参数, 然后利用右侧按钮设置样本信息并选择荧光 (选择 FAM 和 VIC 荧光), 设置完成后点击“OK”按钮并保存样品参数文件。

3.4.4 点击“Start Run”按钮进入程序运行设置界面, 点击“Close Lid”按钮关闭仪器热盖, 然后点击“Start Run”按钮运行程序。

4 结果分析

4.1 反应结束后保存检测数据文件。

4.2 分析条件设置: 根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值、stop 值以及 Threshold 的 Value 值 (用户可根据实际情况自行调整, Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20, 调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线), 点击 Analysis 自动获得分析结果, 在 Report 界面察看结果 (LightCycler480 和 BioRad CFX-96 仪器可参照仪器自动分析结果, 也可手动调节)。

5 质量控制

阴性质控品: FAM 检测通道扩增曲线无对数增长长期;

阳性质控品: FAM 检测通道扩增曲线有明显对数增长长期, 呈典型 S 型扩增曲线, 且强阳性和临界阳性质控品的定值分别在 $1.0 \times 10^4 \sim 4.0 \times 10^5$ TCID₅₀/mL 和 $1.0 \times 10^1 \sim 1.0 \times 10^3$ TCID₅₀/mL 范围内;

以上质控品的 VIC 检测通道扩增曲线均有对数增长长期;

SFTSV 阳性定量参考品: FAM 检测通道扩增曲线有明显对数增长长期, 呈典型 S 型曲线, CT 值 < 35, 且 $R^2 \geq 0.98$; VIC 通道可能存在扩增曲线;

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。

6 结果判定

6.1 如果检测样品的反应体系扩增曲线在 FAM 检测通道无对数增长长期或 Ct 值 > 35, 且在 VIC 检测通道有对数增长长期, 可判样品为发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒浓度低于检测灵敏度;

6.2 如果 FAM 荧光信号增幅明显, 扩增曲线有明显对数增长长期, 呈典型 S 型曲线, 且 Ct 值 ≤ 35, 则按以下方法判断:

若样品的 $C < 1.00E+002$, 则该样品的发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA 浓度 $< 1 \times 10^2$ TCID₅₀/mL;

若样品的 $1.00E+002 \leq C \leq 1.00E+006$, 则该样品的发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA 浓度 = C TCID₅₀/mL;

若样品的 $C > 1.00E+006$, 则该样品的发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA 浓度 $> 1 \times 10^6$ TCID₅₀/mL。如果需要精确定量结果, 可将样品用阴性质控品稀释到线性范围后再检测。则该样品的发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA 浓度 = (C × 稀释倍数) TCID₅₀/mL。

【阳性判断值】通过临床样本检测结果分析, 利用 ROC 曲线法最终确定本试剂盒的参考值为 CT 值为 35。

【检验结果的解释】

1 每次实验均需检测阴性质控品, 强阳性质控品, 临界阳性质控品, 质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。

2 阳性结果判定标准: 扩增曲线在 FAM, VIC 检测通道均有对数增长长期。

3 阴性结果判定标准: 扩增曲线在 FAM 检测通道无明显对数增长长期, 在 VIC 检测通道有对数增长长期。

4 报告建议采用以下格式:

阴性结果报告格式为: 样本未检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA, 浓度低于试剂盒的灵敏度;

阳性结果报告格式为:

1) 当样本的试验结果浓度 $C < 1.00E+002$, 报告格式为: 样本检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA, 浓度小于 1×10^2 TCID₅₀/mL, 表明病毒载量较低, 该检测结果仅供参考, 建议随访;

2) 当样本试验结果浓度在 $1.00E+002 \leq C \leq 1.00E+006$ 时, 报告格式为: 样本检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA, 其浓度为 C TCID₅₀/mL;

3) 当样本的试验结果浓度 $C > 1.00E+006$ 时, 报告格式为: 样本检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA, 浓度大于 1×10^6 TCID₅₀/mL, 如经稀释后检测, 则报告格式为: 样本检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒 RNA, 浓度为 (C × 稀释倍数) TCID₅₀/mL。

5 本检测结果仅供临床参考, 如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

6 示例:

样本 1 和 2 使用本试剂盒进行检测, 上机图及定量结果见图 1、图 2、图 3 和表 1。图 1 包括阳性定量参考品 1-4、待检测样本 1 和 2 (箭头所指为待检样本扩增曲线); 图 2 为阴性质控品、强阳性质控品、临界阳性质控品。

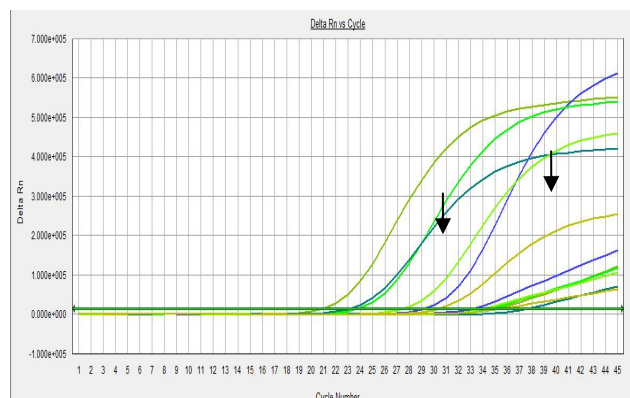


图 1 扩增图

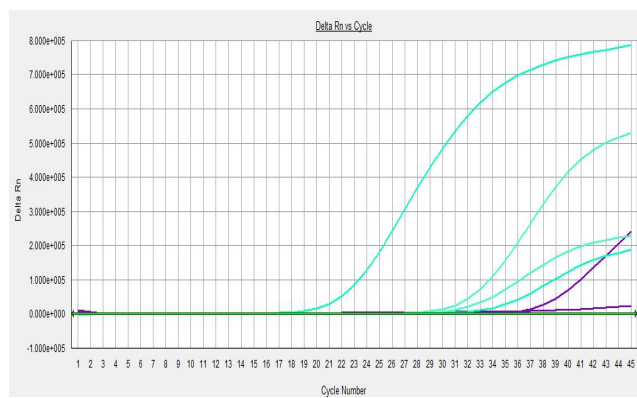


图 2 质控品

表1 检测结果

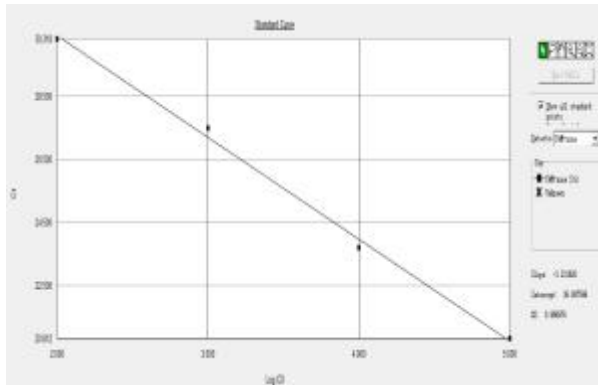


图3 标准曲线

从以上图表可知，标准曲线的相关系数为0.998，强阳性质控品、临界强阳性质控品和阴性质控品均满足试剂盒要求，可以进行结果判定。由表1知，样本1的定量值 $1.84 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ，样本2的定量值 $2.83 \times 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

报告格式为：样本1检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒RNA，其浓度为 $1.84 \times 10^4 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ；样本2检测到发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒RNA，其浓度为 $2.83 \times 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。

7 结果的换算

TCID_{50} 与copies的换算关系如下： $10^x \text{TCID}_{50}/\text{mL} = 0.496 \times 10^{x+3} \text{copies}/\text{mL}$ 。

【检验方法的局限性】

样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

根据产品分析性能评估结果，本试剂盒的灵敏度为 $10 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ ，线性范围为 $1.0 \times 10^2 \text{TCID}_{50}/\text{mL} \sim 1.0 \times 10^6 \text{TCID}_{50}/\text{mL}$ 。与感染部位相同或感染症状相似的其他病毒（伤寒杆菌，登革热病毒I、II、III、IV型，汉坦病毒I、II，普马拉病毒）无交叉反应。内源性干扰物胆红素浓度不高于 $20 \text{mg}/\text{mL}$ 、甘油三酯浓度不高于 $3000 \text{mg}/\text{dL}$ 、血红蛋白浓度不高于 $6 \text{g}/\text{dL}$ ，则不干扰本试剂盒检测结果。临床试验结果显示，本试剂盒的阳性符合率为98.66%，阴性符合率为100%，总符合率为99.60%。

【注意事项】

1. 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，实验过程严格分区进行（试剂准备区、标本制备区、扩增和产物分析区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，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；
2. 为试剂和标本准备阶段提供生物安全柜，实验过程中穿工作服，带一次性手套，使用自卸管移液器；
3. 试剂使用前要完全解冻， $8,000 \text{rpm}$ 离心数秒后使用；
4. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；
5. 实验完毕用10%次氯酸或75%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射20—30分钟；
6. 本试剂盒内阳性质控品应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求：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》。

【参考文献】

1. 发热伴血小板减少综合征防治指南（2010版）。中华人民共和国卫生部 www.moh.gov.cn
2. 发热伴血小板减少综合征实验室检测方案（2010版）。中华人民共和国卫生部 www.moh.gov.cn
3. 于学杰，梁米芳，李德新等，新型布尼亚病毒感染引起中国出现的发热伴血小板减少综合征，新英格兰医学杂志(NEJM) 2011, 364(16):1523-32.
4. 李德新. 发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒概述, 中华实验和临床病毒学杂志.2011, 5

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路19号

联系方式：

传真：020-32068820

电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820

电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路19号；广州市高新技术产业开发区荔枝山路6号；广州市黄埔区香山路17号B104号房。

生产许可证编号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期及修改日期】