

六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】六项呼吸道病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】50 人份/盒

【预期用途】

本品用于体外定性检测人口咽拭子样本中呼吸道合胞病毒（RSV）、呼吸道腺病毒（Radv）、人偏肺病毒（HMPV）、副流感病毒 I/II/III 型（PIVI/II/III）的核酸。

呼吸道感染是临床常见病症，可由多种病毒引起。常见的呼吸道病毒包括：呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒、副流感病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒等。呼吸道感染可以引起多种疾病，如感冒、流感、咽炎、喉炎、支气管炎、肺炎等，人体感染后主要临床症状，包括发热、流涕、咽痛、咳嗽、头痛和腹泻等。由于这些病毒引起的感染症状和流行特点相似，仅靠临床症状对病原进行区分非常不可靠，实验室诊断方法有病毒分离、抗原检测与核酸检测等。检测结果用于临床对呼吸道疾病的辅助诊断，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以六种呼吸道病毒：呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒、副流感病毒 I/II/III 型的保守区域为靶区域，分别设计特异性引物和探针，通过 2 管检测，同时实现对六种病毒 RNA/DNA 快速检测。经过核酸提取后的临床样本，加入到试剂盒中提供的检测试剂配制成的 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。本试剂盒设置了内参对照，用于对样本采集、保存和运输以及核酸提取过程进行监控，避免假阴性结果的误判。

【主要组成成分】

组分名称	规格及数量	主要成分
核酸扩增反应液	1200μL×1 管	镁离子、核苷酸混合液等
酶混合液	400μL×1 管	DNA 聚合酶、逆转录酶、UNG 酶
A 管反应液	200μL×1 管	副流感病毒 I 型、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒和内参 RnaseP 的引物、探针
B 管反应液	200μL×1 管	呼吸道合胞病毒、副流感病毒 II/III 型和内参 RnaseP 的引物、探针
阳性对照	500μL×1 管	含浓度均为 10 ⁶ ~10 ⁷ copies/mL 的呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒、副流感病毒 I/II/III 型和 RnaseP 基因特异性片段的病毒样颗粒
阴性对照	500μL×1 管	0.9%氯化钠溶液

说明：

- 不同批号的组分不可以互换使用。
- 自备试剂：a. 核酸提取试剂盒，采用上海伯杰医疗科技股份有限公司生产的核酸提取及纯化试剂（沪奉械备 20180202 号）；b. 样本保存液：生理盐水或阻止细菌和真菌生长的抗生素缓冲液（含青霉素-链霉素-两性霉素 B 溶液（100×）和 10mM PBS 缓冲液（PH 6.2）稀释比例 1：99）。

【储存条件及有效期】

- 避光-20±5℃储存，有效期 12 个月。
- 采用泡沫箱加冰袋的运输方式，运输及开箱温度不得高于 8℃，运输不超过 4 天。开封后避光-20±5℃储存，对有效期没有影响。避免反复冻融，冻融 6 次不影响检测效果。
- 生产日期、有效期至：见外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 适用样本类型为口咽拭子样本。
- 样本采集：用压舌板轻压舌部，迅速用拭子（推荐聚酯纤维拭子或棉签拭子）擦拭患者口腔两侧腭弓及咽、扁桃体的分泌物，避免拭子触及其他部位；将拭子头浸入采样液中（含 1mL 生理盐水或 3mL 阻止细菌和真菌生长的抗生素缓冲液），在采样液中压拭子头部数次，弃去尾部，旋紧管盖，以防干燥。将采集好的样本注明：编号、样本类型、采集时间。样本提取前，将采

集管（外螺旋扣、耐-80℃冻存）旋涡振荡 1 分钟后混合均匀，再进行核酸提取。

- 样本采集后应及时检测，2℃~8℃保存 3 天内完成检测，超过 3 天应置于-40±5℃或以下保存 12 个月不影响检测结果。避免反复冻融，冻融 6 次不影响检测结果。

【检验方法】

- 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出核酸扩增反应液、酶混合液、A 管反应液（B 管反应液），室温融化，充分振荡混匀后瞬间离心。

计算试剂使用份数 N（N=样本数+1 管阳性对照+1 管阴性对照），根据下表配置反应体系，加入一适当体积离心管中，充分振荡混匀后瞬间离心，按 20μL 分装至 PCR 反应管中，并转移至样本处理区（A 管和 B 管各配制上述 N 份试剂）。

组分名称	加入体积（μL）/人份
核酸扩增反应液	12
酶混合液	4
A 管反应液（B 管反应液）	4
总体积	20

- 样本处理（样本处理区）

① 核酸提取：待测样本、阳性对照及阴性对照按照核酸提取试剂盒说明书进行操作。

② 加样：在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入待测样本、阳性对照和阴性对照核酸各 5μL，终体积为 25μL/管，盖紧管盖，瞬时离心。

- PCR 扩增检测（核酸扩增区）

① 将 PCR 反应管置荧光定量 PCR 仪扩增检测。

② 循环参数设定

步骤	温度	时间	循环数
1 逆转录	50℃	15min	1cycle
2 预变性	95℃	5min	1cycle
3 变性	95℃	15s	45cycles
退火/延伸/检测荧光	55℃	40s	

说明：

① 步骤 3 中 55℃时设置荧光检测。

② ABI7500 荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

- 结果分析参数设定

阈值设定：根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 的 Value 值（Start 值建议设在 3~15、End 值建议设在 5~20，同时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。

【阳性判断值】

对 229 例已知样本进行检测，采用受试者工作特征（ROC）曲线确定呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒、副流感病毒 I/II/III 型的阳性判断值均为 Ct 值≤38。Ct 值为 38 时：副流感病毒 I 型、呼吸道腺病毒、呼吸道合胞病毒、副流感病毒 II 型、副流感病毒 III 型的灵敏度和特异性均为 100%；人偏肺病毒的灵敏度为 99.5%，特异性为 100%。

【检验结果的解释】

- 质控标准

以下要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

	通道	阴性对照	阳性对照
A 管	FAM 通道（PIVI）	无 Ct 值	Ct≤35
	VIC 通道（Radv）	无 Ct 值	Ct≤35
	CY5 通道（HMPV）	无 Ct 值	Ct≤35
	ROX 通道（内标）	——	Ct≤35
B 管	FAM 通道（RSV）	无 Ct 值	Ct≤35
	VIC 通道（PIVII）	无 Ct 值	Ct≤35
	CY5 通道（PIVIII）	无 Ct 值	Ct≤35
	ROX 通道（内标）	——	Ct≤35

2. 结果判读

- ① 在仪器正常, 阳性对照、阴性对照和内标对照检测结果符合质控标准的情况下, 进行待测样本检测结果的分析与判读。
- ② 阳性判读: 以下结果判读成立的条件 ROX 通道 $CT \leq 40$ 。

A 管阳性判读:

- a: FAM 通道 $CT \leq 38$, 副流感 I 型病毒阳性;
- b: VIC 通道 $CT \leq 38$, 呼吸道腺病毒阳性;
- c: CY5 通道 $CT \leq 38$, 人偏肺病毒阳性;

B 管阳性判读:

- a: FAM 通道 $CT \leq 38$, 呼吸道合胞病毒阳性;
- b: VIC 通道 $CT \leq 38$, 副流感 II 型病毒阳性;
- c: CY5 通道 $CT \leq 38$, 副流感 III 型病毒阳性。

- ③ 阴性判读: FAM 通道或 VIC 通道或 CY5 通道 CT 无数值, 内标 $Ct \leq 40$, 样本低于检测限, 判为阴性。

- ④ 复测: 如果 FAM 通道或 VIC 通道或 CY5 通道 $CT > 38$, 内标 $Ct \leq 40$, 则判定结果位于实验灰区, 应对样本进行复检。复检结果若一致, 结果为阳性; 若无 CT 值, 内标 $Ct \leq 40$, 则判定结果为阴性。

【检验方法的局限性】

1. 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。
2. 有关假阴性结果的分析:
 - ① 不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。
 - ② 呼吸道病毒待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。
 - ③ 对于突发的呼吸道病毒, 其检测的最适样本类型及感染后的最佳采样时间可能尚未确认, 因此, 在同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。
3. 待测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. 最低检测限: 1×10^3 copies/mL。
2. 企业内部阳性/阴性参考品符合率: 19 份阳性参考品符合率为 100%; 9 份阴性参考品符合率为 100%。
3. 对同一份精密度参考品进行 20 天、2 人、3 个批号试剂检测, 批内、批间精密度; 日内、日间精密度; 操作者内、间精密度; 实验室内、间精密度的 CV 均不大于 5.0%。
4. 交叉反应: 针对可能与呼吸道合胞病毒、呼吸道腺病毒、人偏肺病毒、副流感病毒 I/II/III 型的样本产生交叉反应的病毒 (甲型流感病毒、乙型流感病毒、人冠状病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒型、博卡病毒、EB 病毒、麻疹病毒、人偏肺病毒、流行性腮腺炎病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、水痘带状疱疹病毒) 和其他病原体 (百日咳杆菌、流感嗜血杆菌、结核分枝杆菌、金黄色葡萄球菌、脑膜炎奈瑟菌、嗜水气单胞菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、唾液链球菌、肺炎衣原体、肺炎支原体、棒状杆菌属、乳酸杆菌属、卡他莫拉菌、奈瑟氏菌属、表皮葡萄球菌、肺孢子菌、白念珠菌、肺炎克雷伯菌) 均无交叉。
5. 干扰试验: 针对内源性干扰物质粘蛋白 ≤ 0.9 mg/mL、血液 (人类) 50% 和外源性干扰物质苯福林 $120 \mu\text{g/mL}$ 、羟甲唑啉 6.0 ng/mL、氯化钠 (含防腐剂) 0.9%、倍氯美松 $50 \mu\text{g/mL}$ 、地塞米松 0.15 mg/L、氟尼缩松 110 ng/mL、曲安奈德 6.0 mg/L、布地奈德 105 ng/mL、莫米松 0.50 mg/mL、氟替卡松 0.64 mg/mL、盐酸组胺 1.0 mg/mL、鼻内活流感病毒疫苗 6.9 g EID50、苯佐卡因 2 g/mL、薄荷脑 $32 \mu\text{g/L}$ 、扎那米韦 142 ng/mL、利巴韦林 $3.5 \mu\text{g/mL}$ 、奥司他韦 24.6 mg/L、帕拉米韦 $2.5 \mu\text{g/mL}$ 、莫匹罗星 4.49 mg/mL、妥布霉

素 $4 \mu\text{g/mL}$ 进行验证, 对试剂盒的检测均无干扰。

6. 临床评价: 在四家临床机构完成 1821 例样本的临床试验, 呼吸道合胞病毒 (RSV) 与已上市的同类试剂相比, 阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 99.76%, 总符合率为 99.78%; 呼吸道腺病毒 (Radv) 与对比方法 (测序法) 相比, 灵敏度为 100%, 特异性为 99.59%, 总符合率为 99.62%; 人偏肺病毒 (HMPV) 与对比方法 (测序法) 相比, 灵敏度为 100%, 特异性为 99.94%, 总符合率为 99.95%; 副流感病毒型与已上市的同类试剂相比, 阳性符合率为 100%, 阴性符合率为 100%, 总符合率为 100%; 副流感病毒 II 型与对比方法 (测序法) 相比, 灵敏度为 100%, 特异性为 99.94%, 总符合率为 99.95%; 副流感病毒 III 型与已上市的同类试剂相比, 阳性符合率为 99.17%, 阴性符合率为 100%, 总符合率为 99.95%。

【注意事项】

1. 检测前必须仔细阅读本说明书, 并严格按照要求进行操作。
2. 本试剂盒为体外诊断试剂, 操作要求一定的专业性, 操作人员应当经过专业培训。
3. 本试剂盒检测的病原体核酸为 RNA/DNA, 操作过程中使用的所有耗材应不含 DNA 酶和 RNA 酶。
4. 实验室操作按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》进行。实验操作必须严格分区, 各区域使用的仪器、设备、耗材和工作服必须专用, 不得交叉使用, 避免污染。
5. 试剂盒不同批号的组分不可以互换使用, 各组分使用前应室温融化, 充分振荡混匀, 瞬间离心后使用。
6. 反应液分装时应避免产生气泡, 上机前注意检查各反应管是否盖紧。
7. 实验结束后, 应及时清理台面, 并用 10% 次氯酸钠、75% 酒精和紫外灯等措施进行消毒。
8. 试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性, 实验室所有操作应符合《病原微生物实验室生物安全通用准则》; 医疗废弃物处理应按照《医疗废弃物管理条例》进行管理。

【参考文献】

1. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》(卫办医政发 [2010]194 号)。
2. 《病原微生物实验室生物安全通用准则》(WS233-2017)。
3. K J Henrickson. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease[J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(1, Suppl): S6-10.
4. Jan C Varada, BeLete Teferedegne, R Lynne Crim, et al. A neutralization assay for respiratory syncytial virus using a quantitative PCR-based endpoint assessment[J]. ViroL J. 2013; 10: 195. Published online 2013 Jun 15.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 上海伯杰医疗科技股份有限公司
住所: 上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 1302、1303、1304、1305、1306、1307、1309 室
电话: 4008603688 021-61984777
网址: <http://www.bio-germ.com>
售后服务单位名称: 上海伯杰医疗科技股份有限公司
电话: 4008603688 021-61984777
网址: <http://www.bio-germ.com>
生产地址: 上海市奉贤区沪杭公路 1588 号 3 号楼 502 室、1003 室、1302 室
生产许可证编号: 沪药监械生产许 20202563 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20213400567

【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2021 年 07 月 28 日
修改日期: 2022 年 07 月 11 日