

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒适用于副流感病毒1型感染的辅助诊断，结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据，对患者的临床诊治应结合其症状、体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 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，外源内标对上述的监控有方法学的局限性。

【产品性能指标】

1. 最低检测限（分析及灵敏度）：根据产品分析性能评估结果，与金标准方法——病毒分离培养鉴定方法比较，本试剂盒针对副流感1型病毒原体最低检测限为0.03TCID₅₀/0.1mL。
2. 检测10份企业阳性参考品，符合率100%；检测10份企业阴性参考品，符合率100%。
企业的阳性参考品选用了3株副流感病毒1型临床分离株培养物（PIV1/Guangzhou/0701/2011；PIV1/Guangzhou/0702/2012；PIV1/Guangzhou/0703/2012），每株3个浓度（10⁵ TCID₅₀/mL、10⁴ TCID₅₀/mL、10³ TCID₅₀/mL）和1株噬菌体MS2的培养物（浓度10⁴ pfu/mL），企业的阴性参考品选用了10种与副流感病毒1型培养相关（细胞培养液配制后用冻干稀释液稀释100倍、10⁴ 个/mL BHK细胞液）或病毒感染部位相同或引起症状类似的浓度为10⁵ TCID₅₀/mL病毒培养物（A型流感病毒H₃N₂亚型、A型流感病毒季节性H₁N₁亚型、A型流感病毒2009H₁N₁亚型、B型流感病毒、7型腺病毒、3型腺病毒、呼吸道合胞病毒long株、副流感病毒3型）。企业阳性参考品和阴性参考品的原料来源于标准株或临床分离株。
3. 分析特异性：本试剂盒针对副流感病毒1型的检测能力经过了实验室和临床研究的验证，与感染部位相似或者感染症状相似的其他病毒，如呼吸道合胞病毒A/B型、疱疹病毒4/5型、人副流感病毒2/3/4型、A型流感病毒H₃N₂亚型、A型流感病毒H₁N₁亚型、乙型流感病毒、麻疹病毒、流行性腮腺炎病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、结核杆菌、3/7型腺病毒、肠道病毒EV71和CA16、轮状病毒、人偏肺病毒（质粒）、鼻病毒、博卡病毒（质粒）、冠状病毒（质粒）、幽门螺杆菌（核酸）、沙门氏菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、表皮葡萄球菌、铜绿假单胞菌、大肠杆菌、百日咳杆菌、白喉棒状杆菌、干酪乳杆菌、链球菌、卡他莫拉菌、奈瑟菌属、白色念珠菌、寄生虫（核酸）等其它相关病原体均无交叉反应（以上病毒浓度为10⁵ TCID₅₀/mL以上，细菌为10⁶ cfu/mL，肺炎支原体为10⁷ copies/mL，肺炎衣原体为10⁵ TCID₅₀/mL，质粒为10⁶ copies/mL，核酸为1ng/μL）。
4. 精密度：对副流感病毒1型毒株制备的高低两个浓度的精密度参考品进行检测，批内批间不精密度均不大于5%。
5. 常见干扰物质，如血液在5%时，不会对样本检测结果产生影响。但考虑上述干扰物质中的RNA酶的影响，仍提醒采样时应尽量避免上述物质的干扰。
6. 样本中含以下浓度的药物对于本试剂盒使用无影响：0.2mg/L倍氯米松，0.15mg/L地塞米松，12mg/L曲安西龙，0.4mg/L布地奈德，0.05mg/L莫美达松，0.5mg/L氯替卡松，75mg/L苯佐卡因，225mg/L的利巴韦林，0.0125mg/L干扰素，75mg/L妥布霉素，100mg/L阿比多尔，0.125mg/L肾上腺素，0.05%羟甲唑啉，500mg/L氟尼缩松，187.5mg/L头孢克洛，2.5mg/L胸腺素，200mg/L盐酸吗啡，450mg/L对乙酰氨基酚，0.04g/L阿司匹林肠溶片，0.15mg/L安乃近片，0.2g/L布洛芬颗粒，0.05g/L尼美舒利片，0.9g/L赖氨酸，0.1g/L拉米夫定，0.45g/L肌昔片，20mg/L他克莫司软膏，12.5mg/L强的松，0.4g/L环孢素软胶囊，0.1g/L环磷酰胺片，50mg/L阿莫西林，0.6g/L甲硝唑，0.25g/L齐多夫定，0.02g/L司他夫定，0.1g/L奈韦拉平，0.125g/L依非韦林，0.6g/L茚地那韦，0.25g/L克立芝，0.125g/L阿巴卡韦，0.1g/L磺胺嘧啶，1.8g/L粘蛋白。

【注意事项】

1. 本试剂盒用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书，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。
3. 实验室管理应严格按照国家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。实验人员必须进行专业培训；实验过程应分区进行（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不得交叉使用；各区人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染；实验用消耗品（如离心管、移液器吸头等）应有合理的清洁和质控程序，避免RNA酶污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。
4. 为了避免样本中任何潜在的生物危害，检测样品均应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤，样本的处理应在生物安全柜中操作，操作后废弃物均应按医疗废弃物进行无害化处理。核酸提取液A有腐蚀性，如与皮肤接触，请立即用大量清水冲洗。
5. 操作台、移液器、离心机、耗材等仪器用品应经常用含氯消毒液擦拭或浸泡。实验完毕后实验房间、超净工作台应用紫外灯照射处理。
6. 手和灰尘是最常见的RNA酶污染源，操作过程一定要带手套，勤换手套，一旦手套接触到样品，立即更换手套。

【参考文献】

- [1]HENRICKSON K J.Parainfluenza viruses[J].Clin Microbiol Rev, 2003, 16(2):242-264.
- [2]IWANE M K.EDWARDS K M,SZILAGYI P C,et al.Population-based surveillance for hospitalization associated with respiratory syncytial virus, influenza virus, and Parainfluenza viruses among young children [J].Pediatrics,2004,113(6):1758-1764.
- [2]黄志英、董琳、陈小芳等.温州地区儿童副流感病毒感染的流行病学特点[J].实用儿科临床杂志, 2006.21(16):1066-1067.

【基本信息】

注册人/生产企业：广东和信健康科技有限公司
住所：广州市萝岗区瑞发路1号1栋4楼
邮政编码：510530
电话号码：020-82512529 传真号码：020-82514208-177
公司网址：http://www.hecin-scientific.cn
售后服务单位名称：广东和信健康科技有限公司
服务热线：020-82512529 传真号码：020-82514208-177
生产地址：广州市萝岗区瑞发路1号自编(1)栋二层207、广州市萝岗区瑞发路1号自编(2)栋四层
生产企业许可证编号：粤食药监械生产许20193323号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20183400585

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2018年12月19日
修改日期：2019年07月19日

副流感病毒1型核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

说明书

hecin
和信健康

【产品名称】

通用名称：副流感病毒1型核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

48人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人口咽拭子样本中副流感病毒1型（PIV1）核酸。
副流感病毒是婴儿与幼年儿童呼吸道感染的重要病原体，是6个月以内婴儿肺炎和细支气管炎的第二位常见病原体。引起感冒症状如：发烧、咳嗽等。导致反复感染的下呼吸道感染疾病，如肺炎、支气管炎和细支气管炎，特别是在婴幼儿、老年人和有免疫缺陷人群中。本试剂盒的检测对象为具有以上呼吸道感染症状的患者的口咽拭子样本。
副流感病毒（PIV）属副粘病毒科，副粘病毒亚科。副流感病毒根据基因型和抗原性的不同可分为4个不同型，分别为副流感病毒1型和副流感病毒4型，副流感病毒1型和副流感病毒3型属于呼吸道病毒属，副流感病毒2型和副流感病毒4型属于腮腺炎病毒属。副流感病毒1型和副流感病毒3型是引起人类（尤其是在婴幼儿中）上下呼吸道感染的重要病原体。
本试剂盒适用于副流感病毒1型感染的辅助诊断，结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

【检验原理】

本试剂盒利用核酸提取纯化和实时荧光PCR检测技术。
核酸提取试剂，即采用经典的细胞裂解、核酸沉淀、洗涤晾干复溶的方法，采用强变性剂（异硫氰酸胍和N—十二烷基肌氨酸钠等）裂解细胞和病毒，释放出游离的核酸，再利用异丙醇沉淀核酸，75%乙醇洗涤，得到核酸分子。
本试剂盒以副流感病毒1型基因中的高度保守序列HN为靶区域，设计特异性引物和TaqMan荧光探针，副流感病毒1型荧光素为FAM，副流感病毒1型扩增片段长度81bp，内标的荧光素为ROX，内标的扩增片段为66bp。通过进行一步法RT-PCR扩增，在扩增管中实现对口咽拭子样本中副流感病毒1型的快速检测，并通过外源性内标噬菌体MS2和外标质控品（副流感病毒1型强阳性对照、副流感病毒1型阴性对照和阴性对照），对检测过程进行全程质量控制。

【主要组成成分】

类别	组成	主要组份	规格	数量
核 酸 提 取 试 剂	1、核酸提取液 A	异硫氰酸胍	10mL/瓶	1 瓶
	2、核酸提取液 B	异丙醇	10mL/瓶	1 瓶
	3、核酸提取液 C	乙醇、超纯水	10mL/瓶	1 瓶
	4、样本稀释液	超纯水	1.5mL/支	2 支
核 酸 扩 增 试 剂	5、副流感病毒1型 /内标 扩增反应液	副流感病毒1型 引物、副流感病毒1型探针、内标引物、内标探针、脱氧三磷酸核苷、镁离子、缓冲液和超纯水	1.0mL/支	1 支
	6、Taq DNA 聚合酶	Taq DNA 聚合酶	15μL/支	1 支
	7、M-MLV 反转录酶	M-MLV 反转录酶	5μL/支	1 支
质 控 品	8、副流感病毒1型 强阳性对照	灭活副流感病毒1型 （浓度 10 ^{3.5} TCID ₅₀ /ml）	冻干品	2 支
	9、副流感病毒1型 临界阳性对照	灭活副流感病毒1型 （浓度 10 ^{0.5} TCID ₅₀ /ml）	冻干品	2 支
	10、阴性对照	超纯水	100μL/支	1 支
	11、RNA 内标	灭活噬菌体 MS2、牛血清白蛋白、吐温 20	冻干品	2 支

试剂盒不提供但需准备的仪器和耗材：

0.6mL离心管（推荐AXYGEN）
八排管或96孔板（推荐AXYGEN）
移液器（10μL、100μL、200μL、1000μL）
Tip头（10μL、100μL、200μL、1000μL）
离心机（手掌型离心机；高速离心机，转速≥13000rpm）等

备注：

1. 不同批次核酸提取试剂可以混用，不同批次核酸扩增试剂和质控品不得混用；
2. 质控品说明：阴性对照为超纯水；副流感病毒1型强阳性对照和副流感病毒1型临界阳性对照为含副流感病毒1型的冻干品；内标为含MS2噬菌体的冻干品，使用前用样本稀释液复溶，以上质控品均需核酸提取过程处理。

【储存条件及有效期】

试剂盒未开封情况下于-25~-15℃避光保存，有效期12个月。
试剂盒开封后有有效期为6个月，且6个月内开瓶次数不超过3次，开封储存温度-25~-15℃。
尽量避免反复冻融，且冻融次数不超过5次。
试剂盒采用泡沫盒加冰袋或冰袋加干冰（约2kg）封装运输（冰袋的数量以试剂盒上下左右前后完全覆盖试剂盒为标准），泡沫盒内运输温度控制在-80~30℃，并在该条件下密封暂存不超过7天。
生产日期及失效日期见标签。

【通用仪器】

ABI 7500 Real-Time PCR System; 上海宏石医疗科技有限公司全自动医用PCR分析系统 (型号: SLAN-96P); 西安天隆科技有限公司实时荧光定量PCR仪 (型号: TL 988)。

【样本要求】

1. 样本类型: 口咽拭子样本。
2. 样本采集对象: 有呼吸道感染症状、肺炎等患者或有密切接触史的人群。
3. 样本采集器材:
拭子: 应使用头部为合成纤维 (如聚酯纤维) 的塑料杆蓬松拭子。不推荐棉拭子和木杆拭子。
采集管: 推荐使用外螺旋口、耐-70℃冻存的塑料管。
采样液: 病毒采样液推荐使用生理盐水 (其它未验证)。
4. 样本采集部位及方法: 由检查者用压舌板辅助, 将拭子越过被采样者舌根到咽后壁及扁桃体隐窝、侧壁等处, 反复擦拭3~5次, 收集粘膜细胞, 避免触及舌、口腔粘膜和唾液。将拭子头浸入含3ml生理盐水的螺口塑料管中, 尾部弃去, 旋紧管盖。
5. 样本运输: 样本应立即用加冰保温盒储存并运送至实验室。
6. 样本保存:
短期: 保存在2-8℃, 24小时内检测结果稳定。
长期: 保存在-70℃, 3个月内检测结果稳定。
样本在运输和储存过程中要尽量避免反复冻融, 反复冻融不超过3次, 检测前需充分解冻。

【检验方法】

- 一、使用前准备:
1. 需准备的物品: 0.6mL离心管, 移液器吸头, 离心机 (配0.6mL转子或适配器)。推荐使用进口离心管和带滤芯移液器吸头进行操作, 检测过程中勿使用带荧光物质的一次性乳胶手套。
2. 分别用200μL样本稀释液复溶副流感病毒1型强阳性对照、副流感病毒1型临界阳性对照和RNA内标, 混匀并短暂离心, 备用。
3. 试剂盒中各组份 (除Taq DNA 聚合酶和M-MLV反转录酶) 充分解冻并混匀。
- 二、核酸提取 (在样本处理区进行):
所有离心步骤均可在室温下进行。如离心机有制冷功能, 请将温度设定在25℃。
1. 取200μL 核酸提取液A于n (n=样本数+3个外标质控品) 个0.6mL离心管中, 每管加入5μL RNA内标 (注意: 阴性对照不用加内标!)。
2. 每管分别加入待检样本、副流感病毒1型强阳性对照、副流感病毒1型临界阳性对照和阴性对照各50μL, 做好标记, 充分混匀并短暂离心, 室温静置3分钟;
3. 每管加入200μL核酸提取液B, 充分混匀, 13000rpm离心10分钟, 吸弃上清;
4. 每管加入200μL核酸提取液C, 颠倒数次混匀, 13000rpm离心5分钟, 吸弃上清, 开盖在室温或55℃放置2~5分钟晾干;
5. 每管加入25μL样本稀释液, 盖上管盖, 用手指弹管底部或振荡器震荡, 使核酸充分溶解, 短暂离心使液体全部落于管底部, 冰上或2-8℃放置, 用于RT-PCR检测。
- 三、RT-PCR扩增:
RT-PCR扩增包括副流感病毒1型和内标扩增反应。
1. 配液 (在试剂准备区进行): 取出副流感病毒1型/内标扩增反应液, 室温融化后充分混匀, 短暂离心, 并按反应个数n (n=样本数+3个外标质控品) 分别取反应液和酶按照以下配比配置反应液:

试剂	副流感病毒1型/内标扩增反应液	Taq DNA 聚合酶	M-MLV反转录酶
用量 (n人份)	20μL×n	0.3μL×n	0.1μL×n

- 计算好各试剂用量, 加入适当体积于离心管中, 充分混匀, 短暂离心, 然后按20μL/管分装到透明PCR八排管或96孔PCR反应板中, 转移至样本处理区;
2. 加样 (在样本处理区进行): 分别加入5μL步骤二中处理好的样本核酸、副流感病毒1型强阳性对照、副流感病毒1型临界阳性对照和阴性对照, 盖好管盖 (透明平盖), 手掌离心机离心15s将管壁上的液体甩到管底, 如有气泡轻弹管壁消除气泡, 再次离心, 转移至核酸扩增区;
 3. RT-PCR扩增 (在核酸扩增区进行):
将反应管/板置于PCR仪样品槽中, FAM、ROX两种荧光同时勾选, 其中FAM荧光指示副流感病毒1型, ROX荧光指示内标, 荧光采集为Stage3 Step2 [55℃ 00:35], 循环参数设定:

步骤	循环数	温度	时间
1	1	48℃	5 分钟
2	1	94℃	2 分钟
3	40	94℃	10 秒
		55℃	35 秒

注: 如使用ABI 7500 Real-Time PCR System, 请务必于passive reference和quencher处选择“none”;

四、结果分析

1. 反应结束后仪器自动保存数据文件, 根据相关仪器的软件进行分析。
2. 分析条件设置
2.1 ABI 7500 Real-Time PCR System: 根据分析后图像调节Baseline的start值、end值 (可根据试验情况自行调整, 一般情况下start值可变范围在1~10, end值可变范围在5~20)。在Linear图谱窗口设置Threshold的Value值, 或者直接拉动Threshold线, 使得threshold线位于扩增曲线指数扩增期。选择Analyze自动分析结果。
- 2.2 上海宏石医疗科技有限公司全自动医用PCR分析系统: 根据分析后图像调节基线起点和终点 (可根据试验情况自行调整, 一般情况下基线起点可变范围在1~10, 基线终点可变范围在5~20); 在基本参数窗口设置阈值, 或者直接拉动阈值线, 使得阈值线位于扩增曲线的指数扩增期, 选择“分析”自动分析结果。

2.3 西安天隆科技有限公司的实时荧光定量PCR仪: 根据分析后图像在结果分析窗口设置阈值, 或者直接拉动阈值线, 使得阈值线位于扩增曲线的指数扩增期。选择“重新分析”自动分析结果。

3. 记录样本Ct值。

五、质量控制

1. 阴性对照需在FAM和ROX荧光素下荧光信号均无明显增长, 且无明显S型扩增曲线。
2. 副流感病毒1型强阳性对照需在FAM荧光素下荧光信号有明显增长, 呈典型的S型曲线, 且Ct值≤21.00; 在荧光素ROX下内标的荧光信号有明显的增长, 呈典型的S型曲线, 且Ct值≤35.00。
3. 副流感病毒1型临界阳性对照需在FAM荧光素下荧光信号均有明显增长, 呈典型的S型曲线, 且Ct值≤30.00; 在荧光素ROX下内标的荧光信号有明显的增长, 呈典型的S型曲线, 且Ct值≤35.00。
4. 要求在同一实验中的同一荧光素下设置相同的阈值 (Threshold), 并同时满足以上三条质控要求; 选择FAM荧光素时, 临界阳性对照与强阳性对照的差值≥6.00, 否则, 实验结果不成立。

【阳性判断值】

局限性: 每个实验室应考虑阳性判断值 (参考范围) 的适用性, 如有必要, 应自行确定。同时将年龄、性别和种族等其他相关鉴别作为参考因素。用临床阴性样本稀释病毒培养物至检测限水平, 通过分析检测限参考品结果的单侧上限95%置信区间确定本试剂盒的阳性判断值为35.00。同时用SPSS软件对587例临床样本 (阳性样本57例, 阴性样本530例, 阳性样本覆盖高、中、低值样本) 进行ROC曲线分析, 约登指数达到最大的临界点作为最佳诊断阈值, 验证本试剂盒的阳性判断值为Ct值35.00。除Ct值要求外, 对于接近阳性判断值的弱阳性结果或者接近阳性判断值阴性结果建议结合扩增结果的S型曲线对结果进行判断, 详见结果判定表格:

结果判定表格

Ct 值		结果判定
副流感病毒1型 (FAM)	内标 (ROX)	
≤35.00	任何	副流感病毒1型 阳性
>35.00	≤35.00	副流感病毒1型 阴性
>35.00	>35.00 或 Undet	试验不成立, 需对该样本做重复试验或重新采样

备注: 内标Ct值的确定: 对于目的基因检测为阳性, 内标的检测结果可能为阳性, 也有可能因为高浓度的目的基因扩增导致内标检测结果为阴性。

【检验结果的解释】

综合分析仪器给出的各项数据, 设定合理的阈值 (Threshold) 和基线 (Baseline), 使仪器给出正确的结果。结果分析时请分别针对FAM或ROX荧光单独进行判断。

一、质量控制分析

每次试验均需检测阴性对照、强阳性对照和临界阳性对照, 质控品结果满足检验方法中质量控制要求时方可进行检测结果的判定。

二、结果解释:

1. 判定说明:
阴性结果判定: 待检样本无明显荧光增幅且无典型S型曲线, 或待检样品FAM荧光 (副流感病毒1型) Ct>35.00 或Undet, ROX荧光 (内标) Ct≤35.00, 判定为阴性样本。
阳性结果判定: 荧光增幅明显, 且Ct值符合结果判定表格条件, 判定为阳性样本。
2. 结果示例:
待检样本4份使用本试剂盒检测。检测结果包括强阳性对照、临界阳性对照、阴性对照和待检样本1~4, 检测结果如下:

样本	第一次检测结果		第二次检测结果		结果判定
	副流感病毒1型 FAM	内标 ROX	副流感病毒1型 FAM	内标 ROX	
1	24.03	26.29	无需第二次检测		副流感病毒1型 阳性
2	Undet	28.00			副流感病毒1型 阴性
3	21.70	Undet			副流感病毒1型 阳性
4	Undet	Undet	Undet	29.98	副流感病毒1型 阴性
强阳性对照	19.40	26.00	19.18	26.10	正常
临界阳性对照	28.12	27.22	27.88	28.31	
阴性对照	Undet	Undet	Undet	Undet	

3. 结果报告建议采用以下形式:

阴性结果: 样本中未检测到副流感病毒1型核酸, 或样本中被检测物浓度低于试剂盒最低检测限。

阳性结果: 样本中检测到副流感病毒1型核酸。