

麻疹病毒和风疹病毒核酸检测试剂盒 （荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：麻疹病毒和风疹病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

英文名称：Diagnostic Kit for Measles Virus and Rubella Virus (Fluorescent PCR)

【货 号】 JC40201N

【包装规格】 50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于咽拭子样本中麻疹病毒和风疹病毒核酸的定性检测。

麻疹病毒（Measles Virus）是单股负链 RNA 病毒，是副粘病毒科麻疹病毒属的成员。麻疹是由麻疹病毒引起的人类传染性最强的疾病之一，临床上麻疹感染会引起发热、出疹和咳嗽，主要感染儿童但也累及青年人，麻疹也可引起终生残疾包括脑损伤致盲和致聋等。

风疹病毒（Rubella Virus）是单股正链 RNA，是披膜病毒科风疹病毒属的唯一成员。风疹是由风疹病毒引起的一种相对麻疹稍轻微的传染疾病，临床表现为发热和出疹，前驱症状通常表现为低热、头痛、身体不适、食欲不振、颈部淋巴结出现淋巴结病等。

麻疹和风疹分别由麻疹病毒和风疹病毒引起呼吸道、以急性发热出疹为特征的传染病，麻疹风疹流行特点相似，呈全球性分布，有明显的季节分布特点，经常引起暴发流行，严重危害儿童和青少年的健康。在麻疹减毒疫苗的普遍运用之后，不但存在症状典型的麻疹，而且还存在症状不典型的麻疹，容易与风疹混淆。实验室检测方法目前主要有病毒分离、血清学检测、核酸检测等。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以麻疹病毒 N 基因和风疹病毒 E1 基因的保守区设计特异性引物和探针，探针为包括 5'端报告基团和 3'端淬灭基团的寡核苷酸。在 PCR 扩增过程中，当探针完整时，由于淬灭基团靠近报告基团，报告基团发出的荧光被淬灭基团吸收，不发出荧光信号。引物延伸时，与模板结合的探针被 Taq 酶（5'→3'外切核酸酶活性）切断，报告基团与淬灭基团分离，产生荧光信号，荧光定量 PCR 仪根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，从而实现对麻疹病毒和风疹病毒在核酸水平上的定性检测。

本试剂盒设置有内标，内标为人核糖核酸酶 P（RNase P）采用 ROX 荧光素标记，通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程中进行监控，避免检测结果的假阴性。

【试剂盒组成成份】

组份名称	规格及数量	主要成分
核酸扩增反应液	375μl×1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液
酶混合液	250μl×1 管	逆转录酶、RNA 酶抑制剂、Taq 酶
麻疹/风疹反应液	200μl×1 管	含麻疹病毒、风疹病毒及 RNase P 的引物、探针
阳性对照	300μl×1 管	含特异性片段麻疹、风疹病毒和 RNase P 的病毒样颗粒
去 RNA 酶水（空白对照）	500μl×1 管	经焦碳酸二乙酯处理过的水

备注：不同批号间试剂盒组份不能互换。

【储存条件及有效期】

避光-20℃贮存，有效期 12 个月。冰袋低温运输不能超过 4 天；反复冻融次数不能超过 5 次。

【适用仪器】

ABI7500 实时荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本类型：咽拭子。
2. 样本的采集：拭子越过舌根到咽后壁及扁桃体隐窝、侧壁等处，反复擦拭 3~5 次，避免触及舌、口腔黏膜和唾液。将拭子从口中慢慢取出、插入到 3mL~5mL 病毒标本保存液（VTM）（含 10% Hanks 基础液，2%牛血清蛋白和 0.1%青链霉素，PH=7.4；参考国家标准《麻疹风疹病毒感染的诊断手册》），在靠近顶端处折断棉签棒，旋紧管盖并密封，以防干燥。
3. 样本保存和运输：样本采集后应及时检测，-20℃保存期 6 个月，-70℃保存期至少为 12 个月。样本避免反复冻融，冻融次数不能超过 5 次，采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

【检验方法】

1. 试剂准备（试剂准备区）

按反应液配制表中的比例取相应量的核酸扩增反应液、酶混合液、麻疹/风疹反应液和去 RNA 酶水，充分混匀后按 20μl/管分装至 N 个（N=待测样本数 +2 管对照）PCR 反应管中。

反应液配制表（每人份）

反应液组份	加量（μl）/每人份
核酸扩增反应液	7.5
酶混合液	5
麻疹/风疹反应液	4
去 RNA 酶水	3.5
总体积	20

2. 样本处理（样本处理区）

2.1 核酸提取 取 200μl 待测样本、阳性对照和空白对照，用 Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit（货号：52904）或者 Roche 公司的高 Pure Viral Nucleic Acid Kit（货号：11858874001）提取试剂盒提取 RNA，按试剂盒说明书操作。阳性对照及空白对照取 200 μl/次进行提取。

2.2 加样 在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入处理好的待测样本 RNA、空白对照 RNA 和阳性对照 RNA 各 5μl，终体积为 25μl/管，盖紧管盖，瞬时低速离心。

3. RT-PCR 扩增检测（核酸扩增区）

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 ABI7500 操作说明

3.2.1 循环参数设定

步骤		温度	时间	循环数
1	逆转录	50℃	30min	1 cycle
2	预变性	95℃	5 min	1 cycle
3	变性	95℃	10 s	45 cycles
	退火、延伸及检测荧光	55℃	40 s	
步骤3中55℃时荧光检测，检测通道：FAM、VIC、ROX				

步骤 3 中 55℃时荧光检测，检测通道：FAM、VIC、ROX

*注：ABI7500 实时荧光 PCR 仪不选 ROX 校正，淬灭基团选 None。

3.2.2 结果分析

反应结束自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（可以根据实际情况自行调整，Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，调整空白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 界面查看结果。

【参考值（参考范围）】

在正常人群中不应检测出麻疹病毒和风疹病毒的核酸，利用受试者工作曲线（ROC）确定本试剂盒的麻疹病毒的临界 Ct 值为 36.6；风疹病毒的临界 Ct 值为 36.3。

【检验结果的解释】

质量控制

- 1.空白对照：无典型S型扩增曲线显示。
- 2.阳性对照：FAM、VIC和ROX呈典型S型扩增曲线且界Ct值 ≤ 30 。
- 3.以上要求需在同一实验中同时满足，否则本次实验无效。

结果判读

在仪器正常，阳性对照和空白对照均正常的情况下进行结果分析（FAM通道为麻疹病毒、VIC通道为风疹病毒、ROX通道为内标）。

FAM通道：

- 1.阳性：待测样本检测结果Ct ≤ 36.6 ，扩增曲线呈S型且有明显指数增长期，判断麻疹病毒为阳性，当样本浓度过高可能导致内标扩增失败。
- 2.阴性：在Ct > 36.6 或未检出，且内标的Ct ≤ 35 ，此次结果判断麻疹病毒为阴性。

VIC通道：

- 1.阳性：待测样本检测结果Ct ≤ 36.3 ，扩增曲线呈S型且有明显指数增长期，判断风疹病毒为阳性，当样本浓度过高可能导致内标扩增失败。
- 2.阴性：在Ct > 36.3 或未检出，且内标的Ct ≤ 35 ，此次结果判断风疹病毒为阴性。

【检验方法的局限性】

本试剂盒的检测结果显示与样本采集、运输及保存条件有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。如果样本在处理过程中发生交叉污染，则可能出现假阳性结果。

本试剂盒中的内标靶基因为人的管家基因-核糖核酸酶P，实验室的耗材容易被人体表面携带的核酸污染，可能导致试剂盒中空白对照的ROX通道有扩增。

【产品性能指标】

- 1.最低检测限：麻疹病毒为10TCID₅₀/ml、风疹病毒为20TCID₅₀/ml；
- 2.特异性：与10⁵TCID₅₀/ml的肠道病毒71型、柯萨奇病毒A16型、腺病毒I型、腺病毒III型、水痘-带状疱疹病毒、鼻病毒、单纯疱疹病毒、腮腺炎病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、呼吸道合胞病毒、及10⁵CFU/ml的肺炎链球菌、肺炎支原体、伤寒沙门氏菌和副伤寒沙门氏菌无交叉反应。
- 3.精密度：检测精密度参考品的变异系数 $< 5\%$ 。
- 4.当常见的干扰物质如血液、脓液、安定、阿昔洛韦，病毒唑，病毒灵和盐酸金刚乙胺在检验样本中的浓度分别为25%、25%、10 mg/ml、200 mg/ml、200 mg/ml、200 mg/ml、200 mg/ml时，不会影响到样本检测结果。

【注意事项】

- 1.本试剂盒为体外检测试剂。操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
- 2.为保证实验结果的准确性和可靠性请使用已校准的移液器，选用合格的一次性使用的PCR反应管、离心管、枪头等，进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含DNA酶和RNA酶。
- 3.实验请严格分区操作；各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后请立即清洁工作台。
- 4.本产品使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。
- 5.样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
- 6.每次实验应设置空白对照和阳性对照。不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
- 7.-70℃保存的核酸样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
- 8.分装有反应液的反应管应扣盖或装入密实袋内再转移至样本处理区。
- 9.加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

10.反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，避免泄露污染仪器。

11.扩增完毕取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。

12.实验中用过的枪头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同丢弃。

13.工作台及各种实验用物品经常用10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。

14.实时荧光PCR仪器需经常校正和清洁载样板板孔。

15.本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》相关要求。

【参考文献】

[1]Judith M,et al. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. Journal of Virological Methods ,149 (2008) 246–250

[2]María del Mar Mosquera, et al. Simultaneous Detection of Measles Virus, Rubella Virus, and Parvovirus B19 by Using Multiplex PCR. Journal of Clinical Microbiology, Jan.2002,P. 111-116.

【生产企业】江苏硕世生物科技股份有限公司

地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村A幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村F幢（G14四楼办研区）

邮编：225300

电话：0523-86201616

传真：0523-86201617

网址：www.s-sbio.com

【医疗器械生产许可证编号】苏食药监械生产许20100121号

【医疗器械注册证编号】国械注准20143402135

【产品标准编号】YZB/国4637-2014

【说明书批准日期及修改日期】2014.12.05