

六项呼吸道病原体核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：六项呼吸道病原体核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人咽拭子样本中甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、人鼻病毒和肺炎支原体的核酸。

本试剂盒可区分样本中上述不同病原体，但无法区分同一病原体的具体型别。检测结果可用于呼吸道病原体感染的辅助诊断，为呼吸道病原体感染提供分子诊断依据。

呼吸道感染分为上呼吸道感染与下呼吸道感染，是指病原体感染人体的鼻腔、咽喉、气管、支气管或肺部，表现为发热、肿痛、咳嗽、头痛等症状。呼吸道病原体具有感染力强、传播快、潜伏期短、发病急等特点，严重危害人类的健康。

流行性感冒病毒(influenza virus)，简称流感病毒，是一种造成人类及动物患流行性感冒的 RNA 病毒，在分类学上，流感病毒属于正黏液病毒科(Orthomyxoviridae)，它会造成急性上呼吸道感染，并借由空气迅速的传播，在世界各地常会有周期性的大流行。人流感病毒分为甲(A)、乙(B)、丙(C)三型，是流行性感冒（流感）的病原体，甲型流感的危害最大，其中乙型、丙型致病性弱，不易发生变异。甲型流感病毒(Influenza A Virus, Flu A)又分许多亚型，至今 HA 有 18 个亚型，NA 有 11 个亚型；乙型流感(Influenza B Virus, Flu B)可分为 Yamagata 和 Victoria 两大谱系。

呼吸道合胞病毒(respiratory syncytial virus, RSV)属副黏病毒科肺炎属的 RNA 病毒，临床研究表明，呼吸道合胞病毒是引起病毒性肺炎的最常见的病原，多见于三岁以下的婴幼儿，主要症状有高热、鼻炎、咽炎及喉炎，以后表现为细支气管炎及肺炎。少数患儿可并发中耳炎、胸膜炎及心肌炎等。成人和年长儿童感染后，主要表现为上呼吸道感染。

腺病毒(Adenoviruses, Adv)属于腺病毒科(Adenoviridae)，根据免疫学、生物学、生物化学特性不同，将其分为 A~G 7 个亚种，不同的基因型有不同的器官亲和性并引起相应的临床表现；腺病毒感染主要以呼吸道感染症状为主，包括高热、咳嗽、咽喉痛，少数可发展为重症肺炎。

人鼻病毒(Human rhinovirus, HRV)属于小核糖核酸病毒科肠道病毒属，是一组单正链的小分子 RNA 病毒，是导致呼吸道感染中重要的致病因子，在成人主要引起普通感冒，而在婴幼儿和儿童，除上呼吸道感染外，还可引起支气管炎和支气管肺炎、急性哮喘等疾病。

肺炎支原体(Mycoplasma Pneumonia, MP)是社区获得性肺炎的常见病原体，感染 MP 后可引起支原体肺炎，支原体肺炎的病理改变以间质性肺炎为主，有时并发支气管肺炎。主要经飞沫传染，潜伏期 2~3 周，发病率以青少年最高。临床症状较轻，大多数患者只有头痛、咽痛、发热、咳嗽等一般的呼吸道症状；少数会持续高热不退，剧烈咳嗽，病情进展快，短时间内出现呼吸衰竭，多器官功能性障碍等危重症表现。

目前实验室检测上述呼吸道病原体的主要方法包括：病毒分离和鉴定、RT-PCR、胶体金等。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。阴性结果不能排除其它呼吸道病毒感染，不能用作诊断、治疗或其他管理决策的唯一依据。阳性结果不能排除检测指标外细菌感染或其他病毒混合感染情况。

【检验原理】

本试剂盒利用针对检测病原体核酸保守区设计的特异性引物、特异荧光探针，配以 PCR 反应液等组分，在荧光定量 PCR 仪上，应用多重实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现对样本中的呼吸道病原体核酸的快速检测。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），通过检测样本中编码甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)的人管家基因是否正常扩增来监测待测样本提取过程和 PCR 扩增过程，避免假阴性结果。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下组分组成：

序号	试剂名称	规格与装量	主要成分
1	呼六-PCR反应液A	1044μL管×1管	PCR buffer(23%)、引物（5.5%）、探针(1.8%)、dNTPs（1.8%）、Mg ²⁺ （0.2%）等
2	呼六-PCR反应液B	1044μL/管×1管	PCR buffer(23%)、引物（5.1%）、探针(1.6%)、dNTPs（1.8%）、Mg ²⁺ （0.2%）等
3	呼六-酶混合液	72μL/管×1管	H-Taq酶（80%）、MMLV酶（20%）
4	呼六-阳性对照	1.0mL/管×1管	慢病毒颗粒、克隆质粒
5	呼六-阴性对照	1.0mL/管×1管	生理盐水
6	呼六-内标	50μL/管×1管	慢病毒颗粒

备注：

- 1) 需要但未提供的试剂：推荐使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）进行核酸提取。
- 2) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。
- 3) 试剂盒内的生物样本均已经灭活处理。
- 4) 自备试验器材：无 DNA 酶、RNA 酶的 1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管、吸嘴（建议使用带滤芯吸嘴，规格：10μL、200μL、1000μL）；离心机；震荡混合器；（磁珠）分离器；各种规格的加样枪。

【储存条件及有效期】

试剂盒-20±5℃避光密闭保存，有效期为 11 个月。生产日期及失效日期请见外包装盒。

开瓶和冻融稳定性实验结果表明：本试剂盒在开瓶后，每周使用 1 次、共连续进行 3 次开瓶，性能稳定。本试剂反复冻融 3 次，性能稳定。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪、Life Technologies Quant Studio™ 5 荧光 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR

分析系统。

【样本要求】

1. 适用样本类型：咽拭子。
2. 样本采集：用无菌棉拭子拭取双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子置入含采样液（推荐使用生理盐水）的无菌管中，将试管塞紧后，密闭送检。
3. 样本保存和运送：经上述处理后的待测样本在 4℃保存 48 小时，-20℃保存 10 个月，-70℃保存 12 个月，检测效果良好，但应避免反复冻融超过 4 次。适用于本试剂的样本在提取核酸后，应尽快完成检测，如需要先保存再检测，推荐保存条件为：4℃保存不超过 24 小时，-20℃保存不超过 32 小时。标本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）

- 1.1 取出包装盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，混匀后备用；
- 1.2 将呼六-内标按比例加入到呼六-阴性对照中：每 200μL 呼六-阴性对照中加入 10μL 呼六-内标，充分混匀成含有内标的呼六-阴性对照，2000rpm 离心 10s 后备用。
- 1.3 根据待测样本、阳性对照、阴性对照的数量，按比例（呼六-PCR 反应液 A 43.5μL/人份+呼六-酶混合液 1.5μL/人份）取相应量的呼六-PCR 反应液 A 和呼六-酶混合液，充分混匀成 PCR 混合液 A，2000rpm 离心 10s 后备用；按比例（呼六-PCR 反应液 B 43.5μL/人份+呼六-酶混合液 1.5μL/人份）取相应量的呼六-PCR 反应液 B 和呼六-酶混合液，充分混匀成 PCR 混合液 B，2000rpm 离心 10s 后备用。

2. 样本处理与加样（在样本处理区进行）（阴性对照、阳性对照与待测样本同步处理）

2.1 样本处理

取 200μL 待测样本、呼六-阴性对照、呼六-阳性对照到 1.5mL 离心管中，使用圣湘生物科技股份有限公司的核酸提取或纯化试剂按其说明书操作进行核酸提取。

2.2 加样

- 2.2.1 吸取上述处理好的样本、呼六-阳性对照及呼六-阴性对照各 5μL 分别加入对应的 0.2mL PCR 反应管中，每管加入 45μL PCR 混合液 A，盖上管盖；
- 2.2.2 吸取上述处理好的样本、呼六-阳性对照及呼六-阴性对照各 5μL 分别加入对应的 0.2mL PCR 反应管中，每管加入 45μL PCR 混合液 B，盖上管盖；
- 2.2.3 建议采用如表 1 所示的布板方式点样上机检测。

表 1. 建议的点样布板示意图（96 孔板）

PCR 混合液 A					PCR 混合液 B				
阳性对照	样本 7				阳性对照	样本 7			
阴性对照	样本 8				阴性对照	样本 8			
样本 1	样本 9				样本 1	样本 9			
样本 2	...				样本 2	...			
样本 3					样本 3				
样本 4					样本 4				
样本 5					样本 5				
样本 6					样本 6				

3. PCR 扩增（请参照各仪器使用说明书进行设置）

3.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阳性对照、阴性对照及待测样本，并设置样本名称。

3.2 荧光检测通道选择：（以 ABI7500 仪器为例）

3.2.1 PCR 混合液 A

1) 选择 FAM 通道(Reporter: FAM, Quencher: none)检测甲型流感病毒核酸；2) 选择 HEX 或 VIC 通道(Reporter: HEX/VIC, Quencher: none)检测乙型流感病毒核酸；3) 选择 CY5 通道(Reporter: CY5, Quencher: none)检测呼吸道合胞病毒核酸；4) 选择 ROX 通道(Reporter: ROX, Quencher: none)检测内标核酸。设置 Sample Volume 为 50。

3.2.2 PCR 混合液 B

1) 选择 FAM 通道(Reporter: FAM, Quencher: none)检测腺病毒核酸；2) 选择 HEX 或 VIC 通道(Reporter: HEX/VIC, Quencher: none)检测人鼻病毒核酸；3) 选择 CY5 通道(Reporter: CY5, Quencher: none)检测肺炎支原体核酸；4) 选择 ROX 通道(Reporter: ROX, Quencher: none)检测内标核酸。设置 Sample Volume 为 50。

3.3 循环参数设定：

步骤	温度	时间	循环数
1 逆转录	50℃	30 分钟	1
2 预变性	95℃	1 分钟	1
3 变性	95℃	15 秒	45
4 退火，延伸及荧光检测	60℃	30 秒*	
5 仪器冷却（可选）	25℃	10 秒	1

(*注：由于 ABI7500 仪器原因，不能设置为 30 秒，可以设置为 31 秒或 32 秒。)

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

4. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置，以分析 ABI7500 仪器为例）

反应结束后自动保存结果，根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（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 Analyze 进行分析，使各项参数符合下述“5. 质量控制”中的要求，然后到 Plate 窗口下记录 Ct 值。

5. 质量控制

- 5.1 呼六-阴性对照：PCR 混合液 A 和 PCR 混合液 B 分别检测呼六-阴性对照，检测内标均为阳性，即 ROX 通道有明显 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤40，其余 FAM、HEX(或 VIC)、CY5 通道无扩增曲线(No Ct)或 Ct 值>40；
- 5.2 呼六-阳性对照：PCR 混合液 A 和 PCR 混合液 B 分别检测呼六-阳性对照，检测 FAM、HEX(或 VIC)、CY5 通道均有明显 S 型扩增曲线，且检测 Ct 值介于 27-33 之间，ROX 通道无明显扩增曲线(No Ct)或 Ct 值>40；

5.3 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。

【阳性判断值】

根据临床研究实验数据绘制 ROC 曲线，通过参考值的研究，确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 40，内标 Ct 阳性判断值为 40。

【检验结果的解释】

1. 阴阳性判断：

有明显 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤40，判为阳性；无扩增曲线(No Ct)或 Ct 值>40，判为阴性。具体如下：

扩增结果 反应液类别	FAM 通道		HEX(或 VIC)通道		CY5 通道		ROX 通道	
	Ct 值≤40	No Ct 或 Ct 值>40	Ct 值≤40	No Ct 或 Ct 值>40	Ct 值≤40	No Ct 或 Ct 值>40	Ct 值≤40	No Ct 或 Ct 值>40
PCR 混合液 A	Flu A 阳性	Flu A 阴性	Flu B 阳性	Flu B 阴性	RSV 阳性	RSV 阴性	内标 阳性	内标 阴性
PCR 混合液 B	ADV 阳性	ADV 阴性	HRV 阳性	HRV 阴性	MP 阳性	MP 阴性		

2. 对于阳性样本，内标检测结果不作要求；对于阴性样本，其内标检测应为阳性（Ct 值≤40），若其内标 Ct 值>40 或无显示，则该样本的检测结果显示无效，应查找并排除原因，并对此样本重新采样，进行重复实验（若重复试验的检测结果显示无效，请与本公司联系）。

【检验方法的局限性】

样本检测结果与样本采集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。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。本试剂盒检测是针对病原体的保守区，极少发生突变，但不排除病原体在流行过程中的基因突变可能导致假阴性结果。待检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着目前感染了相应病毒或其为临床症状的致病因子。在不同病程、不同阶段采集的标本，检测结果可能不相同。取标本期间如接种减毒活疫苗可能会导致假阳性结果。本试剂检测结果应结合患者临床症状及其他相关医学检查结果进行综合分析，不得单独作为患者管理的依据。

【产品性能指标】

本试剂盒检测企业参考品：检测 20 份企业阳性参考品（P1~P20），阳性符合率 100%。检测 12 份企业阴性参考品（N1~N12），阴性符合率 100%。重复检测 11 份企业精密度参考品（R0、R1~R10）10 次，相应病原体检测通道 Ct 值的变异系数（CV，%）不大于 5.0%。检测 20 份企业检测限参考品（SQ1~SQ20）均满足最低检测限的要求。

本试剂盒的最低检测限：

病原体	最低检测限	病原体	最低检测限
甲型流感病毒	2.0TCID ₅₀ /mL	腺病毒	500.0copies/mL
乙型流感病毒	2.0TCID ₅₀ /mL	肺炎支原体	500.0copies/mL
呼吸道合胞病毒	500.0copies/mL	人鼻病毒	500.0copies/mL

本试剂盒检测甲/乙型流感病毒核酸检测试剂国家参考品：阳性符合率（+/+）为 6/6；阴性符合率（-/-）为 6/6；精密性（CV，%）：CV 均不大于 5.0%；最低检出限：最低检出限参考品 S1 滴度为 2.1×10¹TCID₅₀/L（即 1:10⁶ 稀释）及以上时，检测结果为乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性；S2 滴度为 2.0×10⁰TCID₅₀/L（即 1:10⁶ 稀释）及以上时，检测结果为乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性；S3 滴度为 2.5×10⁻¹TCID₅₀/L（即 1:10⁶ 稀释）及以上时，检测结果为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性；S4 滴度为 1.0×10⁰TCID₅₀/L（即 1:10⁶ 稀释）及以上时，检测结果为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性；S5 滴度为 9.8×10⁻¹TCID₅₀/L（即 1:10⁶ 稀释）及以上时，检测结果为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性。

以下浓度的干扰物质对本试剂盒无干扰：

干扰物名称	终浓度	干扰物名称	终浓度
盐酸羟甲唑啉	100μg/mL	SDS	100μg/mL
地塞米松	50μg/mL	EDTA	10μg/mL
盐酸头孢甲肟	50μg/mL	尿素	100μg/mL
薄荷醇	50μg/mL	血红素	10μg/mL
扎那米韦	100μg/mL	纯化粘蛋白	20μg/mL
利巴韦林	100μg/mL	FeCl ₃	100μg/mL
阿奇霉素	100μg/mL	无水乙醇	20%(v/v)
氯化钠	60μg/mL	人全血	20%(v/v)
倍氯美松	50μg/mL	氟尼缩松	10μg/mL
盐酸组胺	50μg/mL	曲安奈德	100μg/mL
冻干鼻喷流感减毒疫苗	50μg/mL	布地奈德	50μg/mL
苯佐卡因	50μg/mL	莫米松	50μg/mL
莫匹罗星	50μg/mL	氟替卡松	50μg/mL
妥布霉素	50μg/mL	奥司他韦	100μg/mL
苯福林	100μg/mL	帕拉米韦	100μg/mL

以下浓度的病原体样本与本试剂盒无交叉反应：

病原体名称	病原体浓度 (copies/mL)	病原体名称	病原体浓度 (copies/mL)
巨细胞病毒	7.70E+08	水痘带状疱疹病毒	4.07E+08
柯萨奇病毒 A 型	5.68E+08	白喉棒状杆菌	5.14E+06
百日咳杆菌	6.53E+06	保加利亚乳酸杆菌	7.88E+07
肺炎衣原体	4.85E+07	卡他莫拉菌	1.65E+08
流感嗜血杆菌	6.43E+08	表皮葡萄球菌	1.62E+08
唾液链球菌	4.28E+08	化脓性链球菌	3.10E+08
肺炎链球菌	3.88E+08	肺孢子菌	2.76E+08
脑膜炎奈瑟菌	5.18E+06	肺炎克雷伯菌	7.02E+08
结核分枝杆菌	7.84E+07	N1(麻疹病毒)	5.70E+08
2 型人副流感病毒	1.62E+08	N2(腮腺炎病毒)	5.45E+08
3 型人副流感病毒	1.58E+08	N3(风疹病毒)	6.00E+08
EB 病毒	3.61E+08	N4(金黄色葡萄球菌)	6.59E+06
隐球菌	2.71E+08	N5(大肠埃希氏菌)	9.81E+07
烟曲霉	7.82E+08	N6(铜绿假单胞菌)	1.05E+08
黄曲霉	6.08E+08	N7(1 型人副流感病毒)	5.60E+08
白念珠菌	5.66E+08	N8(偏肺病毒)	4.73E+08
嗜肺军团菌	6.94E+06	N9(肠道病毒 71 型)	4.38E+08
博卡病毒	6.47E+08	N10(冠状病毒 229E)	5.93E+06
单纯疱疹病毒 1 型	4.43E+08		

临床试验研究结果：临床研究中，分别与核酸序列测定、各病原体已上市同类产品做对照，同时选择一定的样本与病原体分离培养进行比较研究。与核酸序列测定对比研究总共完成 2122 例，甲型流感病毒总符合率为 99.39%，乙型流感病毒总符合率为 99.62%，呼吸道合胞病毒总符合率为 99.62%，腺病毒总符合率为 99.25%，人鼻病毒总符合率为 99.48%，肺炎支原体总符合率为 99.34%。与上市同类产品的对比研究共完成 725 例，甲型流感病毒总符合率为 99.86%，乙型流感病毒总符合率为 99.86%，呼吸道合胞病毒总符合率为 100%，腺病毒总符合率为 99.45%，人鼻病毒总符合率为 100%，肺炎支原体总符合率为 99.03%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员进行专业培训，实验过程严格分区进行，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。
4. 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性口罩及手套并经常替换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求：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》。
5. 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。
6. 当检测不含人内源性基因的样本时，内标（ROX 通道）可不作要求。

【参考文献】

- [1] Walsh, M. P., et al. 2010. Computational analysis identifies human adenovirus type 55 as a re-emergent acute respiratory disease pathogen. J. Clin. Microbiol. 48:991–993.
- [2] J. Mahony, S. Chong, F. Merante, et al. 2007. Development of a Respiratory Virus Panel Test for Detection of Twenty Human Respiratory Viruses by Use of Multiplex PCR and a Fluid Microbead-Based Assay, JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, p. 2965–2970.
- [3] Jayme Parker, Nisha Fowler, Mary Louise Walmsley, et al. Analytical Sensitivity Comparison between Singleplex Real-Time PCR and a Multiplex PCR Platform for Detecting Respiratory Viruses, PLOS ONE, 2015, 10(11).

【基本信息】

注册人/生产企业名称：圣湘生物科技股份有限公司
住所：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号
联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876
售后服务单位名称：圣湘生物科技股份有限公司
联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876
生产地址：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号
生产许可证编号：湘食药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20213400256

【说明书核准日期及修改日期】2021 年 04 月 09 日