

【产品名称】

通用名称：登革病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装：10 人份/盒、48 人份/盒；

单管单人份：10 人份/盒。

【预期用途】

本品用于定性检测人血清样本中的登革病毒（包括 I、II、III、IV 四种血清型）RNA。

登革病毒（dengue virus, DV）属黄病毒科黄病毒属，是有包膜的单股正链 RNA 病毒，包括 I、II、III、IV 四种血清型。登革病毒具感染性，病人及隐性感染者是本病的主要传染源，而丛林中的灵长类是维持病毒在自然界传播的动物宿主，主要通过埃及伊蚊（*Aedes aegypti*）和白纹伊蚊（*Aedes albopictus*）等媒介昆虫传播，多引起无症状的隐性感染。发病患者的主要临床表现有登革热（dengue fever, DF）以及发病率和死亡率很高的登革出血热（dengue hemorrhagic fever, DHF）和登革休克综合征（dengue shock syndrome, DSS）。登革热以全身毛细血管内皮细胞的广泛性肿胀、渗透性增强、皮肤轻微出血的病理变化为主，与病毒感染的直接作用和免疫病理损伤作用密切相关；主要表现为发热，肌肉痛和骨、关节酸痛，伴有皮疹或轻微的皮肤出血点，血小板轻度减少。登革出血热、登革休克综合征多发生于再次感染异型登革病毒的患者或母亲抗登革病毒抗体阳性的婴儿，病死率高。登革出血热的病情较重，伴有明显的皮肤和粘膜的出血症状，血小板减少和血液浓缩显著；登革休克综合征除上述症状外，主要表现为循环衰竭、血压降低和休克等。目前 DV 的诊断方法有病毒分离、血清学诊断及病毒核酸检测等。

本试剂盒检测结果仅供临床参考，但不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以 DV 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 PCR 扩增，用于标本中 DV RNA 的定性检测。另外，本试剂盒带有内标物质，用于对核酸提取过程及 PCR 扩增过程的监控，可减少假阴性结果的出现。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (大包装 10 人份/盒)	DV PCR 反应液 A	170μL/管	1	DV 特异性引物探针、Tris 盐酸 Buffer 等
	DV PCR 反应液 B	30μL/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
	DV 内标溶液	120μL/管	1	含内标片段的假病毒
PCR 检测试剂 (大包装 48 人份/盒)	DV PCR 反应液 A	816μL/管	1	DV 特异性引物探针、Tris 盐酸 Buffer 等
	DV PCR 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
	DV 内标溶液	240μL/管	1	含内标片段的假病毒
PCR 检测试剂 (单管单人份)	DV PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	10	特异性引物探针、Tris 盐酸 Buffer、热启动 Taq 酶、c-MMLV 酶等
	DV 内标溶液	120μL/管	1	含内标片段的假病毒
质控品 (适用于大包装、单管单人份)	阴性质控品	200μL/管	1	生理盐水
	DV 强阳性质控品	200μL/管	1	含 DV 目的片段的假病毒
	DV 临界阳性质控品	200μL/管	1	含 DV 目的片段的假病毒

注：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】

试剂盒有效期 9 个月。各组分保存于-20±5℃。试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

PCR 检测试剂反复冻融次数不应超过 7 次；试剂盒保存于 4℃，各组分开瓶次数不应超过 7 次；试剂盒在 25℃时运输不应超过 3 天。

【适用仪器】ABI Prism 7300, ABI Prism 7500, Roche LightCycler480, DA7600。

【样本要求】

- 1 适用标本类型：血清。
- 2 标本采集：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 毫升，注入无菌的干燥玻璃管，室温（22~25℃）放置 30~60 min，血标本可自发完全凝集析出血清，或直接使用水平离心机，1500g 离心 5min；吸取上层血清，转移至 1.5mL 灭菌离心管。
- 3 标本保存和运送：所采集的标本可立即用于测试，或保存于-20℃待测，保存期为 6 个月，标本应避免反复冻融。标本运送采用 0℃冰壶或加冰并以泡沫箱密封，低温运输时间不应超过 8h，长途运输建议采用干冰以保持低温。

【检验方法】

1 样本处理和核酸提取（样本处理区）

采用广州达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒（离心柱法）（产品编号：DA0591），具体操作步骤请按照试剂盒说

说明书指引进行。本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，所以须配套提取试剂使用。

本试剂盒中的阴性质控品、强阳性质控品和临界阳性质控品均参与提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。

2 PCR 试剂准备（试剂准备区）

2.1 大包装规格试剂使用：

从试剂盒中取出 DV PCR 反应液 A、DV PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+ DV 临界阳性质控品+DV 强阳性质控品）PCR 反应管，

DV 单人份扩增体系配制如下表：

DV PCR 反应液 A	DV PCR 反应液 B	扩增体系
17μL	3μL	20μL

将各组分充分混合后进行短时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 20μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

2.2 单管单人份规格试剂使用：直接使用 DV PCR 反应管。

3 加样（样本制备区）

往上述对应的 DV 反应管中分别加入提取后的待测样本核酸、阴性质控品核酸、临界阳性质控品核酸、强阳性质控品核酸 5μL，盖紧管盖，8,000g 离心数秒后转移至扩增检测区。

4 PCR 扩增（扩增检测区）

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 ABI Prism 7500 仪器设置（ABI Prism 7300 仪器设置参照此操作）

4.2.1 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（Unknow），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。

4.2.2 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。

4.3 LightCycler480仪器设置

4.3.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为FAM,VIC。

4.3.2 设置循环条件：

Program name	Cycles	Target(℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 15: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	45	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

4.3.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称、类型，在“Standard Concentration”框中输入标准品浓度，设置完成后，保存文件，运行程序。

4.4 DA7600 仪器设置

4.4.1打开软件后，在设置程序参数界面中，设置扩增程序和温度设置，条件如下：

编号	程序名	循环	目标温度	恒温时间	读取荧光
1	1	1	50	00: 15: 00	
2	2	1	95	00: 15: 00	
3	3	45	94	00: 00: 15	
			55	00: 00: 45	√
4	4	1	40	00: 00: 20	

4.4.2 点击样本参数界面，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（UNK），并在“样本名称”一栏中设置样本名称；探针染料类型选择：FAM 和 VIC。

4.4.3 设置完成后，保存文件，运行程序。

5 结果分析(请参照各仪器使用说明书进行设置，以 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，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果，在此基础上，微调阈值线位置使所得标准曲线的 R² 值最大即可在“Report”窗口读取检测结果。

6 质量控制

	FAM 通道	VIC 通道	结果判定
阴性质控品	Undet 或 No Ct	Ct 值≤43	DV 阴性

临界阳性质控品	Ct 值≤36	有或无扩增曲线	DV 阳性
强阳性质控品	Ct 值≤28	有或无扩增曲线	DV 阳性

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。

7 结果判断

- 7.1 如果 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≥43 或 FAM 检测通道无扩增曲线，且在 VIC 检测通道有扩增曲线，可判样品为登革病毒阴性；
- 7.2 如果 FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值<43，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为登革病毒阳性。

【参考值（参考范围）】

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 43。

【检验结果的解释】

- 1 每次实验均需检测阴性质控品，临界阳性质控品及强阳性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：FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值<43，VIC 检测通道有或无扩增曲线；
- 3 阴性结果判定标准：FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≥43 或 FAM 检测通道无扩增曲线，VIC 检测通道有扩增曲线；
- 4 报告建议采用以下格式：
阴性结果报告格式为：样本未检测到登革病毒 RNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；
阳性结果报告格式为：样本检测到登革病毒 RNA。

【检测方法的局限性】

- 1 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关；
- 2 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；
- 3 病毒在流行过程中的基因突变则也可能导致假阴性结果；
- 4 由于不同提取方法的原理不同，采用不同核酸提取试剂进行样本处理时核酸提取效率存在一定差异，本试剂盒使用广州达安基因股份有限公司生产的核酸提取试剂盒（离心柱法）（产品编号：DA0591）；
- 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。

【产品性能指标】

- 1 企业参考品的符合率：10 份阳性参考品符合率 100%（10/10）；10 份阴性参考品符合率 100%（10/10）
- 2 最低检出限：1.47×10¹TCID₅₀/mL。
- 3 分析特异性：
- 3.1 与以下病原体临床样本无交叉反应：

发热伴血小板减少综合征布尼亚病毒	汉滩病毒	汉城病毒
普马拉病毒	乙型肝炎病毒	基孔肯雅病毒
西尼罗病毒	黄热病毒	甲型流感病毒
乙型流感病毒	麻疹病毒	风疹病毒
副流感病毒 I 型	副流感病毒 II 型	副流感病毒 III 型
副流感病毒 IV 型		

- 3.2 干扰反应：胆红素（0.1 mg/mL）、甘油三酯（1mg/mL）、血色素（0.2mg/mL）等内源性物质不干扰试剂盒检测结果；样本中可能存在药峰浓度的利巴韦林（0.3mg/mL）、泼尼松（0.5mg/mL）、地塞米松（0.1mg /mL）不干扰试剂盒检测结果。
- 4 批内精密度及批间精密度：ct 值的 CV%均小于 10%。

【注意事项】

- 1 本产品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书；
- 2 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：包括卫生部《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》；
- 3 产物处理：PCR 结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃；
- 4 全程应避免 RNA 酶污染，实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道；
- 5 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头；
- 6 PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融；
- 7 如果在标本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性；
- 8 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、样本制备区、扩增检测区），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；
- 9 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20-30 分钟；
- 10 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于-20℃待用(24h 内)；

- 11 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；
- 12 须对每次实验进行质量控制。

【参考文献】

- 1 Paudel D, Jarman R, Limkittikul K, Klungthong C, Chamnanchanunt S, Nisalak A, Gibbons R, Chokejindachai W. Comparison of real-time SYBR green dengue assay with real-time taqman RT-PCR dengue assay and the conventional nested PCR for diagnosis of primary and secondary dengue infection. N Am J Med Sci. 2011 Oct;3(10):478-85.
- 2 Poloni TR, Oliveira AS, Alfonso HL, Galvão LR, Amarilla AA, Poloni DF, Figueiredo LT, Aquino VH. Detection of dengue virus in saliva and urine by real time RT-PCR. Virol J. 2010 Jan 27;7:22
- 3 Jarman RG, Nisalak A, Anderson KB, Klungthong C, Thaisomboonsuk B, Kaneechit W, Kalayanarooj S, Gibbons RV. Factors influencing dengue virus isolation by C6/36 cell culture and mosquito inoculation of nested PCR-positive clinical samples. Am J Trop Med Hyg. 2011 Feb;84(2):218-23.

【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>

售后和服务单位名称：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

【说明书核准日期及修改日期