

呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法) 说明书

【产品名称】

通用名称：呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【货 号】 JC10216N

【包装规格】 50 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于婴幼儿咽拭子样本中呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型核酸分型定性检测。

呼吸道合胞病毒(Respiratory syncytial virus, RSV)属肺炎病毒属，根据其黏附蛋白 G 抗原性的不同，分为 A 型和 B 型，其 A 型和 B 型所引起的临床症状较为相似。RSV 是婴幼儿下呼吸道感染的最主要病原体，2~6 个月发病率最高，潜伏期 3~7 日，症状较重，可有高热、鼻炎、咽炎及喉炎，之后表现为细支气管炎及肺炎。少数病儿可并发中耳炎、胸膜炎及心肌炎等。早产、先天性心脏病、肺发育不良等是致危的主要因素。RSV 感染不仅可诱发哮喘，而且与病情的加重有关。成人和年长儿童感染后，主要表现为上呼吸道感染。

RSV 通常在冬、春季节流行，并具有亚型分布差异。该病经空气飞沫和密切接触传播。实验室检测方法目前主要有病毒分离、免疫学诊断、核酸检测等。

【检测原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，以 RSV 基因组 P 蛋白基因区域设计 A 型和 B 型特异性引物和探针，分别以 FAM 和 VIC 标记相应亚型。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 RSV 在核酸水平上的分型定性检测。

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。

【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	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
呼吸道合胞病毒 A 型/B 型反应液	200μL×1 管	含呼吸道合胞病毒 A 型、B 型及 RNase P 的引物、探针
阳性对照	300μL×1 管	含呼吸道合胞病毒 A 型、B 型病毒培养液和含 RNaseP 特异性型片段的病毒样颗粒
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分不能互换；本试剂盒不包含但对检测必需的配套提取试剂：硕世生物的病毒核酸提取试剂盒（货号：SDK60101）、Qiagen 公司的 RNA 提取试剂盒 QIAamp Viral RNA Mini Kit（货号：52904）或者 Roche 公司的 High Pure Viral Nucleic Acid Kit（货号：11858874001）提取试剂盒。

【储存条件及有效期】

避光-20±5℃保存，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。

生产日期、有效期至：见试剂盒外包装。

【适用仪器】

ABI7500 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本类型：咽拭子
2. 样本的采集：采集病人发病 3 日内的咽拭子样本，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）中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖密封，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、呼吸道合胞病毒 A 型/B 型反应液和去 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
呼吸道合胞病毒 A 型/B 型反应液	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 推荐用硕世生物的病毒核酸提取试剂盒、Qiagen 公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit 或者 Roche 公司的 High Pure Viral Nucleic Acid Kit 提取试剂盒提取 RNA，按试剂盒说明书操作。

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、阳性对照各 5μL，至终体积为 25μL/管，盖紧管盖，瞬时低速离心。

3. 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	逆转录反应	50℃	30 min	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				

*注：ABI 系列荧光 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 界面察看结果。

【阳性判断值】

在正常人群中不应检测出呼吸道合胞病毒 A 型和 B 型的核酸，利用受试者工作曲线（ROC）确定本试剂盒的呼吸道合胞病毒 A 型的临界 Ct 值为 36.3；呼吸道合胞病毒 B 型的临界 Ct 值为 35.0。

【检验结果的解释】

质量控制：

通道	Ct 值		
	FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道
空白对照	UNDET	UNDET	UNDET

阳性对照	Ct≤30.0	Ct≤30.0	Ct≤30.0
------	---------	---------	---------

注：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通道代表呼吸道合胞病毒A型，VIC通道代表呼吸道合胞病毒B型，ROX通道代表内标）。

	FAM通道 Ct值	VIC通道 Ct值	ROX通道 Ct值	结果判读
1	Ct≤36.3	Ct>35.0 或 UNDET	不要求	呼吸道合胞病毒A型阳性
2	Ct>36.3 或 UNDET	Ct≤35.0	不要求	呼吸道合胞病毒B型阳性
3	Ct≤36.3	Ct≤35.0	不要求	呼吸道合胞病毒A型和B型阳性
4	Ct>36.3 或 UNDET	Ct>35.0 或 UNDET	Ct≤35.0	呼吸道合胞病毒A型和B型阴性

注：当样本检测结果为阳性时，若内标无扩增信号或者Ct值>35，其阳性结果仍然可信。

【检验方法的局限性】

检测结果和样本采样、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】

- 最低检测限：呼吸道合胞病毒A型：10TCID₅₀/mL，呼吸道合胞病毒B型：10TCID₅₀/mL。检测国家最低检出限参考品满足其说明书要求。
- 特异性：与其感染部位相同或感染症状相似且常见的其他病原体（半数组织培养感染量为1×10⁵ TCID₅₀/mL的甲型流感病毒H1N1亚型、甲型流感病毒H5亚型、甲型流感病毒H9亚型、副流感病毒1型、副流感病毒2型、副流感病毒3型、副流感病毒4型、偏肺病毒、冠状病毒OC43亚型、博卡病毒、麻疹病毒以及浓度为1×10⁸ CFU/mL的肺炎链球菌、肺炎克雷伯菌、A组B型链球菌、嗜肺军团菌、流感嗜血杆菌、肺炎支原体、肺炎衣原体）以及人类白细胞的总RNA无交叉反应。
- 准确性：

以国家参考品P1、P2或经企业标化的阳性参考品P1~P5对试剂检测，检测结果应为呼吸道合胞病毒A型阳性、B型阴性。

以国家参考品P3、P4或经企业标化的阳性参考品P6~P10对试剂检测，检测结果应为呼吸道合胞病毒B型阳性、A型阴性。
- 分析特异性：以国家阴性参考品或经企业标化的阴性参考品检测试剂盒，检测结果应为呼吸道合胞病毒A型和B型均阴性。
- 重复性：本产品具有良好的重复性，检测国家重复性参考品或企业重复性参考品，批内精密度的CV值均小于5%。
- 常见的干扰物质如血液、痰液、美洛西林钠、阿莫西林、病毒唑、阿昔洛韦、盐酸金刚乙胺、干扰素、头孢曲松和头孢他定在检验样本中的浓度分别为25%、25%、6.3 mg/L、0.53mg/L、5.0mg/mL、1.2mg/L、988ng/mL、100单位/mL以及6.0 mg/L、120.5mg/L时，不会影响到样本检测结果。
- 临床试验结果总结：用本试剂盒对950例婴幼儿咽拭子临床样本进行检测。经统计分析本试剂盒与测序法相比较的呼吸道合胞病毒A型阳性符合率为100%，阴性符合率为99.47%，总符合率为99.58%；呼吸道合胞病毒B型的阳性符合率为100%，阴性符合率为99.05%，总符合率为99.26%。

【注意事项】

- 本产品仅用于体外诊断。操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
- 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、枪头等对样本处理及配液等操作，所

有用具应不含DNA酶和RNA酶。

- 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。
- 本产品使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。
- 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。
- 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。
- 待测样本尽可能新鲜，提取过程严防RNA酶污染及操作不当导致的RNA降解。
- 70℃保存的RNA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。
- 分装反应液的反应管应扣盖或装入密封袋内再转移至样本处理区。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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，并与其他废弃物一同丢弃。
- 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。
- 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板孔。
- 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】

- 吴小青，伍平安，曾秀雅，等。福州地区急性呼吸道感染患儿呼吸道合胞病毒检测及亚型分析。实用医学杂志，2008，24(1)：51 - 54。
- Alma C. van de Pol, Anton M. van Loon, et al. Increased detection of respiratory syncytial virus, influenza viruses, parainfluenza viruses, and adenoviruses with real-time PCR in samples from patients with respiratory symptoms. J. Clin. Microbiol., Jul 2007; 45: 2260 - 2262.
- Anurodh S. Agrawal, Mehuli Sarkar, Sekhar Chakrabarti, et al. Comparative evaluation of real-time PCR and conventional RT-PCR during a 2 year surveillance for influenza and respiratory syncytial virus among children with acute respiratory infections in Kolkata, India, reveals a distinct seasonality of infection. J. Med. Microbiol., Dec 2009; 58: 1616 - 1622.
- Munywoki PK. Hamid F. Mutunga M. Welch S. Cane P. Nokes DJ, et al. Improved detection of respiratory viruses in pediatric outpatients with acute respiratory illness by real-time PCR using nasopharyngeal flocked swabs. J Clin Microbiol. Sep 2011; 49: 3365-3367.

【基本信息】

注册人：江苏硕世生物科技股份有限公司
 住所：江苏省泰州市药城大道837号
 联系方式：电话0523-86201616 传真0523-86201617 邮编225300 网址：www.bioperfectus.cn
 售后服务单位名称：江苏硕世生物科技股份有限公司
 联系方式：电话0523-86201616 传真0523-86201617 邮编225300 网址：www.bioperfectus.cn
 生产地址：泰州市医药高新区药城大道 837 号
 生产许可证编号：苏药监械生产许20100121号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20163400799

【说明书核准日期及修改日期】2023年12月27日