

【产品名称】

通用名称：人博卡病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装，20 人份/盒；大包装，48 人份/盒；单管单人份，20 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人鼻咽拭子样本中人博卡病毒脱氧核糖核酸。

本试剂盒用于人博卡病毒感染的辅助诊断，检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

人博卡病毒是在儿童呼吸道分泌物中发现的一种人类细小病毒，属细小病毒科细小病毒组，为单链线状 DNA 病毒。临床研究表明，人博卡病毒感染临床症状表现为急性喘鸣，咳嗽，发热，细支气管炎，肺炎，也有部分患者有腹泻和阵发性咳嗽。人博卡病毒的感染呈全球性分布，常导致儿童呼吸道感染，全年可发病且可与其它病原体形成混合感染。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以人博卡病毒（HBoV）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，用于标本中人博卡病毒 DNA 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	主要组分
PCR 检测试剂 (适用于大包装 20 人份/盒)	HBoV PCR 反应液 A	340μL/管	1	特异性引物和探针、三羟基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	HBoV PCR 反应液 B	60μL/管	1	热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶、dNTPs (含 dUTP)
	HBoV 内标溶液	120μL/管	1	HBoV 内标假病毒
PCR 检测试剂 (适用于大包装 48 人份/盒)	HBoV PCR 反应液 A	816μL/管	1	特异性引物和探针、三羟基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	HBoV PCR 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶、dNTPs (含 dUTP)
	HBoV 内标溶液	240μL/管	1	HBoV 内标假病毒
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份)	HBoV PCR 反应管 (未贴标签管)	1 人份/管	20	特异性引物和探针、三羟基氨基甲烷-盐酸缓冲液、热启动 Taq 酶、尿嘧啶糖基化酶、dNTPs (含 dUTP)
	HBoV 内标溶液	120μL/管	1	HBoV 内标假病毒
质控品 (适用于大包装、单管单人份)	阴性质控品	400μL/管	1	生理盐水
	HBoV 阳性质控品	400μL/管	1	HBoV 假病毒

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用；

需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂。可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂，备案号为粤穗械备 20150301 号或粤穗械备 20170583 号或粤穗械备 20150348 号。

质控品说明：HBoV 阳性质控品为 HBoV 假病毒使用时需进行核酸提取，应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

【储存条件和有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期 9 个月。

试剂在 4℃可保存 7 天；试剂盒在 37℃可保存 72h；避免反复冻融，反复冻融次数不超过 7 次；试剂开瓶次数不超过 7 次。运输条件下，96 小时内不影响本试剂盒的检测性能。

试剂盒生产日期及有效期见产品标签。

【适用仪器】

ABI Prism 7500, Roche LightCycler480, DA7600。

【样本要求】

- 适用标本类型：人鼻咽拭子。
- 标本采集：
 - 鼻咽拭子：将棉拭子轻轻转动，缓缓插入病人鼻孔至颞部，停留片刻后缓慢转动退出，将鼻咽拭子置入无菌采样管，密封送检。门诊病人可以使用该方法。核酸提取前，加灭菌生理盐水 1.5mL 到无菌玻璃管，充分震荡摇匀，挤干棉拭子，立即离心；不立即检测的标本可置于 2-8℃下保存 7 天。
- 标本保存：所采集的标本在-20±5℃的保存时间为 6 个月，在-70±5℃的保存时间至少为 1 年，标本应避免反复冻融。

【检验方法】

1. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（如：备案号：粤穗械备 20150301 号或粤穗械备 20170583 号或粤穗械备 20150348 号），请按照试剂盒说明书进行操作。本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，若核酸提取或纯化试剂未说明内标使用方法，请按样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例在样本中加入内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的阴性质控品和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 HBoV PCR 反应液 A、HBoV 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+ HBoV 阳性质控品）PCR 反应管，

HBoV 单反应扩增体系配制如下表：

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

将各组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 HBoV PCR 反应管。

3. 加样（样本制备区）

往上述对应的 HBoV 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、HBoV 阳性质控品核酸 5μL，盖紧管盖，8,000rpm 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

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（Unknown），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter1: FAM, Quencher1: NONE, Reporter2: VIC, Quencher2: NONE, Passive Reference: NONE。

4.2.2 打开 instrument 窗口，设置循环条件如下：

步骤	循环数	温度(℃)	时间	荧光收集
1	1	50	2 分钟	
2	1	95	15 分钟	
3	40	94	15 秒	
		55	45 秒	√

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：

步骤	循环数	温度(℃)	时间	分析模式	荧光收集模式
1	1	50	2 分钟	None	None
2	1	95	15 分钟	None	None
3	40	94	15 秒	None	None
		55	45 秒	Quantification	Single
4	1	40	20 秒	None	None

4.3.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称、类型，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	2 分钟	
2	2	1	95	15 分钟	
3	3	40	94	15 秒	
			55	45 秒	√
4	4	1	40	20 秒	

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, HEX。

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 ABI Prism 7500 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。

6. 质量控制

6.1 阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线；VIC 检测通道有扩增曲线；

6.2 HBoV 阳性质控品：FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值 ≤32；VIC 检测通道有或无扩增曲线；

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 若检测样品的 FAM 检测通道无扩增曲线，且该 VIC 通道有扩增曲线，可判样品为 HBoV 阴性；
- 7.2 若检测样品的 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 40 ，VIC 检测通道有或无扩增曲线，可判样品为 HBoV 阳性；

【阳性判断值】

本试剂盒的目的通道参考值（Ct 值）为 40。

【检验结果的解释】

1. 每次实验均需检测阴性质控品和阳性质控品，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. FAM 检测通道为阳性时，由于体系的竞争关系，VIC 通道（内标通道）结果可能为阴性；
3. 内标结果为阴性时，若该检测管的 FAM 检测通道也为阴性，说明体系受抑制或操作失误，试验无效，需对该样品进行复检；
4. 报告建议采用以下格式：
阴性结果报告格式为：样本未检测到人博卡病毒 DNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；
阳性结果报告格式为：样本检测到人博卡病毒 DNA。

【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. 病原微生物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的核酸提取效率存在一定差异，推荐使用本产品说明书中检验方法所选用的核酸提取试剂，用户也可根据需求进行选择确认；
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】

产品分析性能评估结果表明：

1. 本试剂盒的灵敏度可达 2×10^2 copies/mL。
2. 阴阳性参考品符合率：5 份阳性参考品符合率为 100%；11 份阴性参考品符合率为 100%。
3. 精密度：批内和批间精密度检测 Ct 值的变异系数（CV，%）均小于 5.0%。
4. 交叉反应：试剂盒对与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体（呼吸道合胞病毒、甲型流感病毒、乙型流感病毒、副流感病毒、腺病毒、人偏肺病毒、鼻病毒、人类冠状病毒 229E 型、人类冠状病毒 OC43 型、人类冠状病毒 NL63 型、人类冠状病毒 HKU1 型、肺炎衣原体、肺炎支原体、轮状病毒、空肠弯曲菌、诺如病毒、星状病毒、沙门氏菌、B19 病毒、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒 1 型、脑膜炎奈瑟菌、水痘带状疱疹病毒、EB 病毒、金黄色葡萄球菌、百日咳杆菌、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、肺孢子菌、白喉棒状杆菌、化脓性链球菌、白念珠菌、唾液链球菌、流感嗜血杆菌、乳酸杆菌、肺炎克雷伯菌、嗜肺军团菌、卡他莫拉菌）无交叉反应。
5. 干扰实验：鼻咽拭子中可能存在的内源性物质（胆红素（0.1 mg/mL）、血红蛋白（200mg/mL）、甘油三酯（2.26mmol/L）和粘蛋白（0.9mg/mL）、血液（含量为 50%），以及外源性干扰物质如常用药物病毒唑（2mg/L）、青霉素（20U/mL）、头孢氨苄（18mg/L）、头孢呋辛（7mg/L）、头孢曲松（150.9mg/L）、莫西沙星（4.4mg/L）、苯福林（100 μ g/mL）、羟甲唑啉（100 μ g/mL）、氯化钠（0.9%）、倍氯美松（100 μ g/mL）、地塞米松（100 μ g/mL）、氟尼缩松（100 μ g/mL）、曲安奈德（100 μ g/mL）、布地奈德（100 μ g/mL）、莫米松（100 μ g/mL）、氟替卡松（100 μ g/mL）、盐酸组胺（100 μ g/mL）、干扰素（300U/mL）、扎那米韦（100 μ g/mL）、利巴韦林（100 μ g/mL）、奥司他韦（100 μ g/mL）、帕拉米韦（100 μ g/mL）、莫匹罗星（100 μ g/mL）、妥布霉素（100 μ g/mL）苯佐卡因（200mg/mL）、薄荷脑（200mg/mL）对本试剂盒检测结果均无明显影响。
6. 临床试验：首次临床试验和补充临床试验共入组了 923 例样本与 Sanger 测序法进行比较，考核试剂的检测阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 98.38%，总符合率为 98.70%；kappa 检验一致性分析表明，考核试剂与测序法检测结果一致性较好（kappa=0.960）；补充临床试验入组了 386 例样本与病毒分离培养鉴定方法进行比较，经统计分析，与病毒分离培养鉴定法相比，考核试剂的检测阳性符合率为 100.00%，阴性符合率为 92.70%，总符合率为 93.26%。

【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. 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. 如果在样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；
11. 须对每次实验进行质量控制。

【参考文献】

- [1]Lu X,Chittaganpitch M,Olsen SJ,et al.Real-time PCR assays for detection of bocavirus in human specimens[J].J Clin Microbiol,2006,44(9):3231-3235.
- [2]Chow B D,Esper F P.The human bocaviruses:a review and discussion of their role in infection[M].Clin Lab Med,2009,29(4):695-713..
- [3]Kantola K,Sadeghi M,Antikainen J,et al.Real-time quantitative PCR detection of four human bocaviruses[J].J Clin Microbiol,2010,48(11):4044-4050.

【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：邮政编码：510665

电话：400 000 0340 020-32290789

传真：020-32068820

网址：<http://www.daangene.com>

售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：邮政编码：510665

电话：400 000 0340 020-32290789

传真：020-32068820

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：粤食药监械生产许 20040999 号

【医疗器械注册证/产品技术要求编号

【说明书核准日期及修改日期】