

人鼻病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：人鼻病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于临床对可疑感染患者的痰液、咽拭子标本中的人鼻病毒核酸进行定性检测。根据相关文献研究^[1,2,3,4]，人鼻病毒(Human Rhinovirus, HRV)是无包膜的二十面体结构，基因组长 7.2-8.5kb，为单链正向 RNA 基因组。基因组 5'端编码病毒蛋白质，与哺乳动物相同，该病毒基因组的 3'端也为 polyA 尾结构。5'端区域编码结构蛋白，非结构蛋白由 3'端区域编码。鼻病毒是引起人类病毒性呼吸道感染最常见的病原体，成人约 20%的感冒都是由鼻病毒感染引起的，而儿童感冒有 15%~30%是由鼻病毒致病，其中有许多病例发展为哮喘、充血性心衰、支气管扩张，包囊纤维化等严重并发症。

目前临床或实验室用于 HRV 检测的方法有：病毒分离培养、抗体中和检测、免疫组化检测、间接免疫荧光检测、酶联免疫吸附试验、基因芯片、核苷酸序列测定及荧光定量 PCR 技术等。

【检测原理】

本试剂盒根据 RT-PCR 原理，针对人鼻病毒特异性保守区域设计相应的引物及探针，配以逆转录酶、TaqDNA 聚合酶以及核苷酸单体，扩增前先将人鼻病毒经逆转录酶作用后变为 cDNA，然后进入 PCR 扩增。PCR 扩增时加入一对引物及一个特异性的荧光探针，该探针为一寡核苷酸序列，两端分别标记一个报告荧光基团和一个淬灭基团。未发生 PCR 扩增时，荧光探针保持完整，报告基团发射的荧光信号被淬灭基团所吸收，无荧光信号产生。当 PCR 扩增时，探针结合到靶序列相应的模板上，Taq 酶的 5'端至 3'端外切酶活性将探针酶切降解，使报告荧光基团和淬灭基团分离，从而使荧光监测系统可监测到荧光信号，即每扩增一条 DNA 链，就有一个荧光分子形成，实现了荧光信号的累积与 PCR 产物完全同步，从而实现检测结果的定性分析。

【主要组成成分】

组分名称	规格	数量 (管)	主要组成成分
逆转录-聚合酶链式反应液	1mL/管	1	人鼻病毒引物、荧光探针、缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、内标引物、内标探针及焦碳酸二乙酯水
聚合酶链式反应酶液	115μL/管	1	热聚合酶、逆转录酶、RNA 酶抑制剂
内标	150μL/管	1	含有内标扩增序列的非传染性 DNA 片段
阴性质控品	100μL/管	1	生理盐水
阳性质控品	100μL/管	1	含高浓度人鼻病毒片段的假病毒
临界阳性质控品	100μL/管	1	含低浓度人鼻病毒片段的假病毒

注：不同批号组分不可互换使用。

【储存条件及有效期】-10℃以下避光保存，有效期 12 个月，反复冻融不超过 3 次。

本试剂盒需低温（0-8℃）运输，运输时间不超过 6 天；试剂盒开瓶后请于 48 小时之内使用完，如不立即使用可在 4℃条件下保存。

【适用仪器】RocheLightCycler480（罗氏 480 型）、ABI7500（应用生物系统 7500 型）

【样本要求】^[5]

1.适用标本类型：疑似病人的咽拭子或痰液标本。

2.标本采集：

咽拭子标本：采集病人发病 3 日内的咽拭子标本，用专用棉拭子采样，适度用力拭抹咽后壁和两侧扁桃体部位，应避免触及舌部；迅速将棉拭子放入装有 3mL 生理盐水的采样管中，在靠近顶端处折断棉签杆，旋紧管盖并密封送检。

痰液标本：采集标本前应用清水漱口或用牙刷清洁口腔和牙齿，有假牙者应取下假牙，用力咳出呼吸道深部的痰（非后鼻分泌物、非唾液），痰液直接吐入无菌玻璃管中，标本量应 $\geq 1\text{mL}$ 。对于痰量少或无痰或咳痰困难者可用雾化吸入加温至 45℃ 的 10% NaCl 水溶液，使痰液易于排出后咳痰。将痰液标本置入无菌玻璃管，旋紧管盖并密封送检。

注：棉拭子材料要求：使用一次性无菌采样拭子，拭子塞采用高压聚乙烯材料制作，拭杆采用竹子材料制作；拭子头采用脱脂药棉制作。

3.标本保存与运输：样本可立即用于检测；如不立即检测，样本在 4℃ 保存应不超过 24 小时；-20℃ 保存不超过 3 个月，-70℃ 可长期保存，反复冻融不超过 5 次。标本长途运送应采用 0℃ 冰壶，运输时间不超过 6 天。

【检验方法】

一 试验前准备

1.试剂准备（试剂准备区）

取出试剂盒内内标模板、阴性质控品、阳性质控品以及临界阳性质控品待室温溶解。

2.标本处理（标本处理区）

吸取 1mL 痰液样本或咽拭子标本置于 1.5mL 离心管中，12000rpm，离心 3min；吸取 200 μL 标本上清液进行核酸提取。推荐采用商品化的 RNA 提取试剂盒（天根生化科技有限公司的磁珠法病毒 DNA/RNA 提取试剂盒）提取样本，具体操作方法参见试剂盒说明书。提取前每个样本中添加 5 μL 内标。

3.质控品处理（样本处理区）

取阴性质控品、阳性质控品以及临界阳性质控品各 25 μL ，补加生理盐水至 200 μL ，然后添加 5 μL 内标参与核酸提取，提取步骤同上。

4.加样（样本处理区）

按所需检测样品及质控品数目 N，取出需配置的 PCR 反应管。用一适当体积的离心管按照 $(35.8\mu\text{L 反应液} + 4.2\mu\text{L 酶}) \times N$ 的公式配置好反应体系，混匀后向 N 个 PCR 反应管中每管分装 40 μL ，加入样本及质控品的核酸提取物 10 μL ，短暂离心片刻后上机检测。

二 荧光定量 PCR 扩增（扩增区）

a) Roche LightCycler480 操作

1. 仪器设置

1.1 打开仪器进行自检

每次开机时，仪器会自动进行初始化自检程序。自检通过，仪器左侧指示灯变绿。如放置了样本，仪器右侧指示灯变绿。在自检时，不能放置反应板，否则自检无法通过。

1.2 设置反应条件

打开 LightCycler480 操作软件，成功登录后进入 New Experiment 程序设置界面。在“Detection Format”一栏中选择“Dual Color Hydrolysis Probe”项，即双色 TaqMan 水解探针。

在“Programs”界面中设置实验程序如下：

42℃ 30 分钟，95℃ 3 分钟；

95℃ 10 秒、60℃ 1 分钟（收集荧光信号），40 个循环。

点击“Start Run”按钮开始 PCR 扩增。

2.结果分析

2.1 样本设置

点击左侧“Subset Editor”按钮，进入 Subset 设置界面，点击“+”按钮新建亚组，并给其命名。选定要设置的亚组，在右边反应板孔位处选定该亚组所包含的孔位，使所选定的孔位中都出现深兰色凹陷，点击下方“Apply”按钮加以确认。

点击左侧“Sample Editor”按钮，点击左上角的“Abs Quant”按钮，再在“Quantification Sample Type”一栏内对各样本的类型进行编辑（阴性质控品选 Negative Control、阳性/临界阳性质控品选 Positive Control、未知样本选 Unknown）。

2.2 数据分析

点击左侧“Analysis”按钮分析数据，在 Analysis 界面中选择“Abs Quant/Fit Points”，点击“Calculate”按钮，生成 Cp 值（即 Ct 值）。

2.3 到 Report 窗口，点击“Generate”按钮生成报告。

b)ABI7500 操作

1. 仪器设置

1.1 定义样品孔

选定样品孔，选择 FAM 检测通道（荧光淬灭基团设为 none）检测 HRV；选择 HEX 或 VIC(荧光淬灭基团设为 none)检测内标。同时 Passive Reference 设为 none。定义样品孔：阴性质控品选 NTC；待检样品和阳性质控品选 Unknown。

注：若荧光 PCR 仪无 HEX 或 VIC 检测通道，可忽略内标设置且不要在样本处理前加入内标。

1.2 打开 instrument 设置反应条件

42℃30 分钟，95℃3 分钟；

95℃10 秒、60℃1 分钟（收集荧光信号），40 个循环。

2.结果分析

2.1 反应结束后保存反应结果；

2.2 调整 Baseline 的 start 值、stop 值以及 Threshold 的 Value 值使曲线达到最佳。在 Analysis 菜单下选择 Analysis 自动分析反应结果。

2.3 到 Report 窗口，记录标本数值。

三.质量控制

HRV 阴性质控品 FAM 检测通道检测结果应为阴性且无 Ct 值，HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性，有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ；

HRV 阳性质控品 FAM 检测通道检测结果应为有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 30.00 ，HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性，有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ；

HRV 临界阳性质控品 FAM 检测通道检测结果应为有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ，HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性，有扩增曲线且 Ct 值 ≤ 36.00 ；

基线设置：取 3-15 循环的荧光信号作为基线调整的范围，使扩增曲线达到最佳“S”型；

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则实验视为无效。

【检测结果的解释】

在质控品及内标实验结果均有效的前提下，按以下标准判定实验结果：

- 1.如果扩增曲线呈 S 型且 Ct 值 ≤ 36.00 ，则结果为阳性。
- 2.如果扩增曲线 S 型不明显或 $36.00 < \text{Ct 值} < 40.00$ ，则应对该样本进行重新检测，若复检结果仍是 $36.00 < \text{Ct 值} < 40.00$ ，则为阴性。
- 3.如果扩增曲线不呈 S 型、Ct 值为 UNDET 或者无 Ct 值，则结果为阴性。

【检验方法的局限性】

本试剂盒检测结果仅供临床参考,不能作为对人鼻病毒感染患者治疗或者其他临床管理的唯一依据,需结合其他实验室检测、临床情况综合考虑。当实验室发生 PCR 产物气溶胶污染、试剂污染或样品交叉污染时,检测结果会出现假阳性;当试剂运输、保存不当引起的试剂检测效能下降时,检测结果会出现假阴性;当检测样本中被检核酸浓度含量低于 1.0×10^4 pfu/mL 时,也可能会发生假阴性的结果。

【产品性能指标】

根据临床考核结果,本试剂盒对处理后样本的检测下限为 1.0×10^4 pfu/mL,精密度 CV% 小于 5%。特异性试验表明本试剂盒与选取流感病毒 A 型 (H1N1)、流感病毒 A 型 (H3N2)、副流感病毒 1 型、副流感病毒 2 型、副流感病毒 3 型、流感病毒 B 型、呼吸道合胞病毒 A 型、呼吸道合胞病毒 B 型、人腺病毒和肺炎链球菌特异性参考品均无交叉反应;粘蛋白 (2.5mg/mL) 对样本中人鼻病毒测定结果无显著影响。本试剂盒对人鼻病毒的检测结果与同类已上市试剂盒检测结果相比,各项指标为:阳性符合率 99.69%、阴性符合率 99.86%、总符合率 99.81%、一致性系数 (Kappa) 0.9955。

【注意事项】

- 1.本试剂盒仅用于体外诊断。实验人员必须经过严格培训,实验前仔细阅读此说明书。
- 2.实验过程分区进行(试剂准备区、样本处理区、PCR 基因扩增区),每个分区有专用仪器和试剂,防止交叉污染。
- 3.实验过程中应穿工作服,使用一次性不含荧光手套并经常更换,使用自卸式移液器。
- 4.应使用洁净 1.5mL 离心管,移液器吸头不可以重复使用。
- 5.向离心管中加样时,所有液体都要缓慢加至管底,不要残留在管壁上,完成后 5000rpm 离心数秒。
- 6.不同批号的试剂,切勿混用,有效期内使用试剂盒。
- 7.试剂使用前完全解冻,避免反复冻融。
- 8.每次试验完毕用 75%酒精或紫外灯处理工作台和移液器。
- 9.检测过程中遗留的样品、扩增产物及污染的试剂等,应有专门的容器和人员进行处理。
- 10.为保证检测准确性,务必使用经过校准的移液器标准加样。
- 11.本试剂盒内阳性质控品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:《医疗废弃物管理条例》。

【参考文献】

- 1.金奇主编.医学分子病毒学[M].北京:科学出版社,2001.
- 2.王焕焕,毛乃颖,王善振,王增贤.人鼻病毒的研究进展[J].病毒学报,2011,27(3):294-297.
- 3.耿艳艳,陈文芳.检测人鼻病毒 RNA 新方法的建立与应用[J].国外医学(微生物学分册),1999,3:12-19.
- 4.宋明辉,赵林清.北京地区急性呼吸道感染儿童中人鼻病毒感染状况研究[J].病毒学报,2011.3(12).
- 5.叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程(第3版)[M].中华人民共和国卫生部医政司,323-325.

【基本信息】

企业名称:湖北朗德医疗科技有限公司
注册地址:湖北省宜昌市西陵经济开发区西湖路
生产地址:湖北省宜昌市西陵经济开发区西湖路
邮政编码:443000
电话:0717-6384888
传真:0717-6384888

网址：www.landes.com.cn

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20153400295

【说明书核准及修改日期】2020 年 2 月 28 日