

呼吸道病毒核酸六重联检试剂盒（PCR 荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：呼吸道病毒核酸六重联检试剂盒（PCR 荧光探针法）

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定性检测人鼻拭子样本中的甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒 I 型及副流感病毒 III 型核酸。

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。实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

呼吸道感染疾病常见于成人和儿童当中，具有很高的发病率和死亡率。急性上呼吸道和下呼吸道的感染主要通过空气中的飞沫、人与人之间的接触或与被污染物品的接触传播。临床上常见的呼吸道病毒有甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒 I 型及副流感病毒 III 型。由于这些病毒引起的感染症状和流行特点相似，仅靠临床症状对病原进行区分非常不可靠，实验室诊断方法有病毒分离、抗原检测与核酸检测等。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术，分别以甲型流感病毒、乙型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、副流感病毒 I 型及副流感病毒 III 型基因组的保守区和特异区为靶区域设计引物和探针。PCR 扩增过程中，探针与模板结合，探针的 5'端报告基团被 Taq 酶（5'→3'外切核酸酶活性）切断，进而远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器根据检测到的荧光信号自动绘制出实时扩增曲线，并计算出样本 Ct 值（每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数）。反应液 A 中分别使用 FAM、VIC/HEX 和 CY5 荧光基团标记甲型流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒探针；反应液 B 中分别使用 FAM、VIC/HEX、CY5 荧光基团标记副流感病毒 III 型、乙型流感病毒、副流感病毒 I 型的探针。通过使用两管 10×RV 反应液进行联检，可同时进行以上六种呼吸道病毒核酸的定性检测。

本试剂盒设置有内标对照，为呼吸道病毒非相关的基因片段，采用 ROX 荧光基团标记。

【主要组成成分】

序号	组分名称	规格及数量	主要成分
1	无核酸酶水	1000μL×1 管	经焦碳酸二乙酯处理之后的水
2	2×核酸扩增反应液	960μL×1 管	三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、核苷酸混合液、热启动 DNA 聚合酶
3	20×逆转录酶	96μL×1 管	逆转录酶、RNA 酶抑制剂
4	10×RV 反应液（A 管）	96μL×1 管	甲型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒及内标引物探针
5	10×RV 反应液（B 管）	96μL×1 管	乙型流感病毒、副流感病毒 I 型、副流感病毒 III 型及内标引物探针
6	内标对照	480μL×1 管	含非目标基因片段的假病毒
7	阳性对照（RV）	400μL×1 管	含甲型流感病毒、呼吸道合胞病毒、腺病毒、乙型流感病毒、副流感病毒 I 型/III 型基因片段的假病毒
8	阴性对照	400μL×1 管	生理盐水

注：不同批号间试剂盒组分除内标对照（有效期内）外不能互换。

【储存条件及有效期】

试剂盒在-30℃至-15℃避光储存，有效期为 12 个月。

开盖后置于 2-8℃保存，有效期为 15 天。避免反复冻融（冻融次数不得超过 7 次）。0℃以下干冰或冷链运输。

生产日期和失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 和上海宏石 SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

一、适用样本类型：鼻拭子。

二、样本采集

按照《国家流感中心标准操作流程》中关于鼻拭子采集法进行采集。左手扶住患者的下颌部，右手持无菌拭子轻轻插入鼻道内鼻腭处，停留片刻后缓慢转动退出。以另一拭子擦拭另侧鼻孔。将拭子浸入采样液中，在采样液中挤压拭子头部数次，用力折断拭子的尾部，弃去尾部。

采样管的要求：外螺旋口、耐-80℃冻存。

采样液的要求：含有蛋白质稳定剂，阻止细菌和真菌生长的抗生素的缓冲液（可使用 Hank's 或 Eagle's 等培养液加入抗生素和 0.5%BSA）。

三、样本保存和运送

样本在 2-8℃条件下可保存 48h，超过 48h 应置于-90℃至-70℃保存，不超过 6 个月。避免反复冻融（冻融次数不超过 5 次）。

【检验方法】

一、核酸提取（样本处理区）

取 200μL 待测样本、阳性对照和阴性对照，分别将 10μL 内标对照加入其中。推荐使用天根生化科技有限公司核酸提取或纯化试剂（备案号：京海械备 20150027）提取核酸，具体提取步骤请参照相应提取试剂盒说明书。

二、PCR 试剂配制（试剂准备区）

1. 体系配制：从试剂盒中取出试剂，待试剂完全解冻，颠倒混匀后瞬时离心。按 N 个（N=待测样本数+阳性对照+阴性对照+1）反应分别配制两个反应体系，反应体系 A、B 配制如下表。

试剂盒组分	反应体系（A 管）	反应体系（B 管）
2×核酸扩增反应液	10μL×N	10μL×N
10×RV 反应液（A/B）	2μL×N	2μL×N
20×逆转录酶	1μL×N	1μL×N
无核酸酶水	2μL×N	2μL×N

2. 体系分装：将上述反应液混匀离心后，按照每管 15μL 分装于荧光 PCR 仪适用的 PCR 管中。

三、加样（样本处理区）

在分装好试剂的 A、B 反应体系中分别加入 5μL 提取的待测样本核酸、阳性对照核酸和阴性对照核酸，总反应体积为 20μL。扣紧管盖，离心数秒后移至扩增检测区。

四、PCR 扩增检测(核酸扩增区)

1. 将 PCR 反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

2. 循环参数设定：

程序	循环数	温度	反应时间
1	1	45℃	10min
2	1	95℃	5min
3	45	95℃	15sec
		60℃	45sec
			采集荧光

3. 检测设置：检测通道分别设置为 FAM、VIC/HEX、CY5、ROX，分别对应 A 管的甲型流感病毒、腺病毒和呼吸道合胞病毒及内标对照，对应 B 管的副流感病毒 III 型、乙型流感病毒、副流感病毒 I 型及内标对照；ABI 7500 仪器中“Quencher Dye”和“Passive Reference”均设置为 None。按照样本对应顺序设置阳性对照（Positive Control）、阴性对照（Negative Control）和样本（Unknown），并在“样本名称”一栏中设置样本名称。

五、阈值设定

根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 的 Value 值（Start 值建议设在 3~15、End 值建议设在 5~20，同时调整阴性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。

六、质控标准

试剂盒各对照品须达到以下要求，否则实验视为无效。

		阴性对照	阳性对照
A 管	FAM 通道（InflA）	无 Ct 值	Ct≤36
	VIC 通道（adv）	无 Ct 值	Ct≤36
	CY5 通道（RSV）	无 Ct 值	Ct≤36
	ROX 通道（内标对照）	Ct≤36	——
B 管	FAM 通道（PIV3）	无 Ct 值	Ct≤36
	VIC 通道（InflB）	无 Ct 值	Ct≤36
	CY5 通道（PIV1）	无 Ct 值	Ct≤36
	ROX 通道（内标对照）	Ct≤36	——

七、试验结果的计算

荧光定量 PCR 仪自动分析计算出样本 Ct 值。

【阳性判断值】

根据临床试验结果，利用 ROC 曲线法确定本试剂盒六种呼吸道病毒参考值为 Ct 值等于 36。

【检验结果的解释】

1. 在仪器正常、阳性对照、阴性对照和内标对照检测结果符合质控标准的情况下，进行待测样本检测结果的分析与判读。
2. 待测样本扩增曲线呈典型的 S 型曲线，并具备如下条件，判为阳性。

	通道	Ct 值	结果判读
A 管	FAM	Ct≤36	甲型流感病毒阳性
	VIC/HEX	Ct≤36	腺病毒阳性
	CY5	Ct≤36	呼吸道合胞病毒阳性
B 管	FAM	Ct≤36	副流感病毒 III 型阳性
	VIC/HEX	Ct≤36	乙型流感病毒阳性
	CY5	Ct≤36	副流感病毒 I 型阳性

注：待测样本扩增曲线呈典型 S 型曲线，但浓度过高而导致内标对照没有扩增，待测样本可直接判为阳性。也可将待测样本进行稀释重新检测。

3. 实验灰区：如果目的基因通道扩增曲线有对数增长期，且 $36 < Ct \leq 40$ ，内标对照 $Ct \leq 36$ ，则判定结果位于实验灰度区，应对样本进行重新提取后复检。若复检结果若有明显对数增长期，且 $36 < Ct \leq 40$ ，内标对照 $Ct \leq 36$ ，则判定结果为阳性；若无明显对数增长期，内标对照 $Ct \leq 36$ ，则判定结果为阴性。
4. 如果目的基因通道无扩增且内标对照 $Ct > 36$ ，则需要重新提取样本后进行复检或对样本进行稀释后重新提取进行复检。
5. 阴性结果判定：目的基因通道 $Ct > 40$ 或扩增曲线无明显对数增长期，内标对照 $Ct \leq 36$ ，样本低于检测限，判定对应目标结果为阴性。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒的检测结果仅供临床参考，对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 本试剂盒检测的靶序列为呼吸道病毒基因的保守区域，待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。
3. 对于突发的新型呼吸道病毒，其检测的最适样本类型及感染后的最佳采样时间可能尚未确认，因此，在同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。
4. 不合理的样本采集、运送与保存条件，样本中病毒含量过低，均可能导致假阴性结果。
5. 未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子，可能会导致假阴性结果。
6. 样本处理时如未控制交叉污染，其他病原体如含有靶核酸序列，均可能出现假阳性结果。
7. 鉴于各技术平台检测灵敏度的差异，检测结果可能存在与病毒培养、测序法不一致的情况。检测结果仅供临床参考，对患者临床诊治应结合其症状、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

【产品性能指标】

1. 甲型/乙型流感病毒国家参考品（批号：370006-201501）符合情况：
 - 阳性参考品符合率（+/+）为 6/6；
 - 阴性参考品符合率（-/-）为 6/6；
 - 精密性参考品 CV1 和 CV2 分别重复 10 次，CV1 对应乙流阳性、甲流阴性，CV2 对应甲流阳性、乙流阴性，且其 Ct 值的(CV%)均不大于 5.0%；
 - 最低检出限参考品 S1：滴度不高于 2.1×10^3 TCID₅₀/L（即 $1:10^4$ 稀释），检测结果为乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性；S2：滴度不高于 2.0×10^3 TCID₅₀/L（即 $1:10^3$ 稀释），检测结果为乙型流感病毒阳性、甲型流感病毒阴性；S3：滴度不高于 2.5×10^3 TCID₅₀/L（即 $1:10^4$ 稀释），检测结果为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性；S4：滴度不高于 1.0×10^3 TCID₅₀/L（即 $1:10^3$ 稀释），检测结果为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性；S5：滴度不高于 9.8×10^3 TCID₅₀/L（即 $1:10^4$ 稀释），检测结果为甲型流感病毒阳性、乙型流感病毒阴性。
2. 企业内部阳性/阴性参考品符合率：20 份阳性参考品符合率（+/+）为 20/20；10 份阴性参考品符合率（-/-）为 10/10。
3. 精密性：对精密性参考品分别重复检测 10 次，Ct 值变异系数(CV%)≤5.0%。
4. 最低检出限：六种目标的最低检出浓度均为 1.0×10^3 copies/mL。
5. 交叉反应：针对可能与样本产生交叉的其他病原体（偏肺病毒、肠道病毒、冠状病毒、博卡病毒、乳酸杆菌、卡他莫拉杆菌、鼻病毒、水痘带状疱疹病毒、EB 病毒、肺炎衣原体、肺炎支原体、嗜肺军团菌、流感嗜血杆菌、无毒结核分枝杆菌、脑膜炎奈瑟菌、奈瑟氏菌属、金黄色葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓链球菌、鲍曼不动杆菌、嗜麦芽窄食单胞菌、洋葱伯克霍尔德菌、副流感病毒 2 型、副流感病毒 4 型、纹带棒杆菌、诺卡菌、粘质沙雷菌、柠檬酸杆菌、隐球菌、曲霉菌、肺孢子菌、白色念珠菌、肺炎克雷伯菌、鹦鹉热衣原体、Q 热立克次体、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、百日咳杆菌、表皮葡萄球菌）在 10^6 copies/mL～ 10^8 copies/mL 浓度水平下验证，无交叉反应。
6. 干扰物质：针对 25% 血液、鼻咽分泌物（主要成分为黏蛋白）进行验证，未对检测结果产生显著影响；针对治疗感冒和其他呼吸道症状的患者外用或内服常见药物：如扎那米韦（Cmax: 142ng/mL）、利巴韦林（Cmax: 142 ng/mL）、奥司他韦（Cmax: 0.15mg/mL）、帕拉米韦（Cmax: 3.3mg/mL）、莫匹罗星（Cmax: 4.49mg/mL）、妥布霉素（Cmax: 48μg/mL）、

布地奈德（Cmax: 0.52nmol/L）、薄荷脑（Cmax: 32μg/L）、肾上腺素（Cmax: 0.96mg/mL）、地塞米松（Cmax: 0.96mg/mL）、金英（Cmax: 0.05mg/mL）、羟甲唑啉（Cmax: 0.04mg/mL）、倍氯美松（Cmax: 0.05mg/mL）、氯雷他定（Cmax: 0.1mg/mL）、盐酸左西替利嗪（Cmax: 0.1mg/mL）、流感病毒裂解疫苗（Cmax: 30μg/mL）进行验证，未对检测结果产生显著影响。

7. 临床试验结果：本试剂盒在三家临床检测机构共完成了 1206 例鼻拭子样本的临床试验，针对甲型流感病毒，采用已经上市的同类产品作为对比方法，针对另外五种病毒，采用一代测序方法作为对比方法。与对比方法比较，甲型流感病毒的阳性符合率为 96.4%，阴性符合率为 99.6%，总体符合率为 99.0%；乙型流感病毒的阳性符合率为 100.0%，阴性符合率为 99.2%，总体符合率为 99.3%；呼吸道合胞病毒的阳性符合率为 100.0%，阴性符合率为 97.9%，总体符合率为 98.2%；腺病毒的阳性符合率为 100.0%，阴性符合率为 97.6%，总体符合率为 97.7%；副流感病毒 I 型的阳性符合率为 100.0%，阴性符合率为 100%，总体符合率为 100.0%；副流感病毒 III 型的阳性符合率为 100.0%，阴性符合率为 99.3%，总体符合率为 99.3%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测；请在有效期内使用本试剂盒。
2. 实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格。
3. 实验过程应分区进行（试剂准备区、样本处理区、扩增检测区），各区用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染。
4. 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《微生物和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。
5. 试剂盒阳性对照为含目的基因片段的假病毒，内标对照为含非目的基因片段的假病毒，均无潜在传染性，但操作时以上组分仍应视为传染性物质处理。
6. 每次实验应设置阳性对照和阴性对照。
7. 建议使用新鲜待测样本。
8. 核酸提取过程应严防 RNase 和 DNase 污染；完成核酸提取后，建议立即进行检测。
9. 试剂盒各组分使用前请充分融化，长时间放置建议放置在冰上，混匀并瞬时离心后使用，避免反复冻融。
10. 使用已校准的移液器；选用合格的一次性使用的无 DNase 和 RNase 的实验耗材，如 PCR 管、离心管、枪头等。因吸量液体时存在损耗，建议富余配制。
11. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄漏污染仪器。
12. 扩增完毕取出反应管，密封在塑料袋内，丢弃于指定地点，避免污染环境。
13. 实验中用过的枪头应直接打入盛有 10% 次氯酸钠的废物缸内，与其他废弃物一同丢弃。
14. 实验完毕用 500～2000ppm 的次氯酸钠或 75% 酒精及紫外线灯处理工作台和移液器。
15. 实时荧光 PCR 仪需定期校正和清洁；应使用与仪器配套的 PCR 反应管。

【参考文献】

1. 《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》（WS 233-2002）
2. 《医疗废物管理条例》中华人民共和国国务院令（第 380 号）
3. 《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》卫办医政发〔2010〕194 号
4. K J Henrickson. Advances in the laboratory diagnosis of viral respiratory disease[J]. Pediatr Infect Dis J, 2004, 23(1, Suppl): S6-10.
5. Fan J, K J Henrickson, LL Savatski. Rapid simultaneous diagnosis of infections with respiratory syncytial viruses A and B, influenza viruses A and B, and human parainfluenza virus types 1, 2, and 3 by multiplex quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction-enzyme hybridization assay (Hexaplex)[J]. Clin Infect Dis, 1998, 26(6): 1397-1402.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京卓诚惠生生物科技股份有限公司

住所：北京市昌平区科技园区生命园路 29 号 2 层 A204 室

联系方式：010-80727800

售后服务单位名称：北京卓诚惠生生物科技股份有限公司

联系方式：010-80727800

生产地址：北京市昌平区科技园区生命园路 29 号 1 幢 2 层 D203 室、D203-1 室、A204 室、3 层 B304 室

生产许可证编号：京食药监械生产许 20190018 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准 20213400026

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2021 年 1 月 15 日