

人博卡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：人博卡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、咽拭子标本中的人博卡病毒核酸进行定性检测。

根据相关文献研究^[1,2,3,4]，人博卡病毒(Human Bocavirus, HBoV)是一个单链线状 DNA 病毒，直径 25nm 的球形核衣壳为 20 面体对称的六角形病毒颗粒，基因组全长约为 5.6kb，由两个主要的开放阅读框以及一个次要开放阅读框构成。HBoV 是人类呼吸道感染常见而重要的病原体之一，感染多见于小于 5 岁的婴幼儿，高峰年龄在 6 月~2 岁的婴幼儿。在相关呼吸道疾病中，成年人多表现为上呼吸道感染，而小儿表现主要有肺炎、鼻炎、喉炎、支气管炎、毛细支气管炎、支气管哮喘等。

目前临床或实验室用于 HBoV 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】

本试剂盒根据荧光探针 PCR 原理，针对人博卡病毒特异性保守区域设计相应的引物及探针，配以 TaqDNA 聚合酶以及核苷酸单体，对人博卡病毒进行 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
溶液 A	1.4mL/管	1	聚乙二醇 6000
溶液 B	1.4mL/管	1	乙二胺四乙酸 (PH8.0)、十二烷基硫酸钠、三（羟甲基）氨基甲烷 (PH8.0)、乙基苯基聚乙二醇
聚合酶链式反应反应液	1.25mL/管	1	热聚合酶、尿嘧啶-N- 糖基化酶、人博卡病毒引物、人博卡病毒探针、缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、镁离子、内标引物、内标探针及纯化水
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	含高浓度人博卡病毒片段的假病毒
临界阳性质控品	100μL/管	1	含低浓度人博卡病毒片段的假病毒

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：疑似病人的痰液或咽拭子标本。

2.标本采集：

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°C 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。

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。

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°C 保存应不超过 24 小时； -20°C 保存不超过 3 个月， -70°C 可长期保存，反复冻融不超过 5 次。标本长途运送应采用 0°C 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）

取出试剂盒内溶液 A、溶液 B、PCR 反应液、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，5000rpm 离心数秒备用。

2.标本处理（样本处理区）

取待测样本 $100\mu\text{L}$ ，（如样本为痰液则需预处理：1）取 0.5mL 痰液样品加入样品体积 1-3 倍的 4%NaOH 溶液，液化 15min，其中 NaOH 溶液的加入量视痰液样品的粘稠度而定，粘稠度低的加 1-2 倍体积，高的加 2-3 倍体积，以液化完全为标准；2）吸出 1mL 液化后样品置于 1.5mL 离心管中，15000r/min 离心 5min，去上清。加 $800\mu\text{L}$ 灭菌 TE 缓冲液，充分震荡混匀，再次 15000r/min 离心 2min，去上清液，沉淀用 TE 缓冲液重复洗涤 2 次，样品管 4°C 保存备用。）加入等量溶液 A，混匀后 13000rpm 离心 5 分钟，弃上清，加入 $50\mu\text{L}$ 溶液 B，充分混匀后， 100°C 加热 10 分钟，然后 13000rpm 离心 5 分钟，取上清液待测，提取前每个样本中添加 $5\mu\text{L}$ 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 $25\mu\text{L}$ ，补加生理盐水至 $200\mu\text{L}$ ，然后添加 $5\mu\text{L}$ 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 $45\mu\text{L}$ 反应液 $\times$ 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 $45\mu\text{L}$ ，加入样本及质控品的核酸提取物各 $5\mu\text{L}$ ，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:

50℃2 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蓝色凹陷, 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 HBoV; 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

50℃2 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

HBoV 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 $\leq$ 36.00;

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

HBoV 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 $\leq$ 36.00, HEX/VIC 检测通道检测结果应为阳性, 有扩增曲线且 Ct 值 $\leq$ 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, 不能作为对人博卡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 $1.0 \times 10^4 \text{pfu/mL}$ 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 $1.0 \times 10^4 \text{pfu/mL}$, 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) 对样本中人博卡病毒测定结果无显著影响。本试剂盒对人博卡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 100%、阴性符合率 99.73%、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.吴泽刚,李艳,祝成亮等.湖北地区儿童急性呼吸道感染病原体研究[J].中华医院感染学杂志, 2011,21(10): 2129-2131.
- 3.招军,新病原.人博卡病毒的研究[C].中国科协第 179 次青年科学家论坛——传染病病原体变异和致病机制论文集.2008:28-30.
- 4.钟家禹,朱冰,施静等.人博卡病毒广州分离株全基因组序列测定及分析[J].国际医药卫生导报, 2011,17(16): 1933-1936.
- 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：

电话：

传真：

网址：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准及修改日期】

