

猴痘病毒核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

Monkeypox Virus Real Time PCR Kit

【产品名称】

通用名称：猴痘病毒核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）

英文名称：Monkeypox Virus Real Time PCR Kit

【包装规格】25 人份 / 盒，50 人份 / 盒

【预期用途】对人皮肤病变样本、咽拭子以及血液中猴痘病毒（monkeypox virus）DNA 进行检测，可用于对猴痘病毒感染的研究，不适用于临床猴痘病毒感染的疾病诊断。

【检验原理】本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，对猴痘病毒（Monkeypox Virus）的特异性 DNA 核酸片段进行荧光 PCR 检测。

【试剂盒主要组成成分】

序号	组分	25 人份 / 盒	50 人份 / 盒
1	核酸抽提液	1.8mL×1	1.8mL×2
2	MPXV 核酸荧光 PCR 检测混合液	540μL×1	1080μL×1
3	酶（Taq+UNG）	17μL×1	32μL×1
4	阴性对照品	400μL×1	800μL×1
5	阳性对照品	30μL×1	60μL×1

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

【储存条件和有效期】试剂盒应在-20±5℃ 避光保存，有效期 12 个月。采用泡沫盒加冰密封进行运输；试剂盒反复冻融不宜超过 3 次。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABIPrism®7500/7900、SLAN-96S/P、MIC POC Dx48、AutraMic mini4800 Plus、Bio-Rad CFX 96、FQD-96A/C、LightCycler® 480 等 PCR 仪及相应软件。

【标本要求】

1、样本采集：皮肤病变标本（包括病变皮疹、痘疱表面和/或渗出物、痘疱液、痘疱表皮或痘痂），（1）病变皮疹、痘疱表面和/或渗出物的拭子：使用拭子用力涂抹病变部位，以确保收集足够的病毒 DNA，将拭子放入收集管中，密闭送检。

（2）痘疱液：用酒精棉球对皮损处进行消毒，并自然干燥。用无菌针头和注射器吸取液体，放置于收集管中，密闭送检。

（3）皮疹或痘疱表皮、皮疹内液体拭子采集：用酒精棉球对皮损处进行消毒，并自然干燥。用一次性手术刀或无菌针头打开并移除小泡或脓疱的顶部皮肤，将小泡顶部皮肤放置于收集管中。用拭子擦拭皮损底部，将拭子放置于收集管中，密闭送检。

（4）痘痂或硬皮：用酒精棉球对皮损处进行消毒，并自然干燥。用无菌针头或剪刀取至少 4 块痂皮，每块痂皮要来自不同的身体部位，将痂皮放置于收集管中，密闭送检。

注意：可以将两个相同类型的病变标本收集在一个管中，最好是从身体的不同部位收集的，且外观不同。不同类型病变（如痘疱液和痘痂）不能放在同一管中。尽量每种类型标本收集两份，检测时先对其中一份进行检测，仅在第一份结果不确定时再对第二份进行检测。

2、咽拭子：用拭子擦拭双侧扁桃体及咽后壁，将拭子放入无菌收集管中，尾部弃去，旋紧管盖。

3、血清/血浆标本：采集发病后 7 天内或者 3~4 周的全血，采集量 5mL，以空腹血为佳，血浆样本建议用含 EDTA 抗凝剂的真空采血管收集全血*，血清样本用不含抗凝剂的真空采血管收集全血，全血室温静置 30min，1500~2000rpm 离心 10min，收集血清或血浆于收集管中，密封送检。

*注：采集血浆时，不可使用含肝素的抗凝管。

4、标本可立即检测，也可置于 4℃ 下存放不超过 7 天，短期可在-20℃ 中保存，长期存放请存于-70℃ 以下（收集后>60 天），应设立专库或专柜单独保存样本，样本避免反复冻融。

5、样本运输请按照国家相关规定进行运输。

【检验方法】

1.标本、对照品的核酸裂解处理

① 血清/血浆标本可直接取样；拭子样本、痘疱液标本需先加入适量生理盐水或病毒保存液震荡混匀；病变皮疹、痘疱表皮、痘痂或硬皮按质量/体积（1mg：5μL，总体积应大于 50μL）加入相应体积的生理盐水或病毒保存液，研磨或匀浆处理。

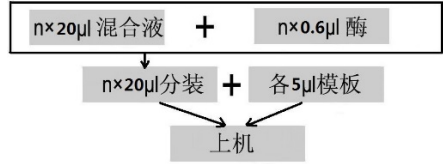
② 取 50μL 上述样本（非病毒保存液），加 50μL 核酸提取液，振荡 10 秒，≥99℃ 干浴或水浴 10 分钟，13000rpm 离心 10 分钟，保留上清备用。

③ 阴性对照按照相同提取方式进行提取，保留上清备用。阳性对照品可不用提取，直接加样。

对组织样本或复杂度高的样本，建议用有纯化功能的商业化提取试剂盒进行提取。

2.试剂配制与加样

取 n×20μL 猴痘病毒核酸荧光 PCR 检测混合液，以及 n×0.6μL 酶（Taq+UNG）（n 为反应管数），振荡混匀数秒，瞬时离心数秒。取上述混合液 20μL 置于 PCR 管中，然后将样品处理上清液、阴性对照和阳性对照品各 5μL 分别加入 PCR 管中，盖好管盖，离心数秒后立即进行 PCR 扩增反应。



3. PCR 扩增

反应管置于定量荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

参数 1：适用于 MIC POC Dx48、AutraMic mini4800 Plus、Bio-Rad CFX 96、FQD-96A/C	1	37℃×2min; 95℃×90sec	循环 1 次
	2	95℃×1sec 63℃×12sec	循环 40 次，单点荧光检测在 63℃

参数 2：适用于 ABI Prism®7500/7900、SLAN-96S/P、LightCycler® 480	1	37℃×2min; 95℃×90sec	循环 1 次
	2	95℃×5sec 63℃×30sec	循环 40 次，单点荧光检测在 63℃

荧光通道检测选择：选用 FAM 和 TEXAS RED 通道。

备注：MIC POC Dx48 机型设置请务必选择 Fast TAQ 模式

如使用 ABI 系列 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

4.基线和阈值设定 基线调整取 6-15 个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

5.质量控制 试剂盒各对照品须达到以下要求，否则实验视为无效。

对照品	FAM 通道 Ct 值 （目的基因）	TEXAS RED 通道 Ct 值 （内标通道）
阴性对照品	UNDET	——
阳性对照品	≤35	——

6.试验结果的判断

	通道	Ct 值	结果判断
1	FAM	UNDET 或无数值	样本低于检测限，报告为阴性
	TEXAS RED	≤35	
2	FAM	≤40	报告为阳性
	TEXAS RED	——	
3	FAM	无数值	样本采集量不足，建议重新采样
	TEXAS RED	> 35	

备注：如果检测对象为非人源样品（如物品表面，环境样本等），则该产品内标 TEXAS RED 通道无法监控样本采样过程的有效性，故在结果判断时无需考虑 TEXAS RED 通道的质控要求。

【对检验结果的解释】

实验室环境污染，试剂污染，样品交叉污染会出现假阳性结果；试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，出现假阴性或定量检测不准确的结果。

【检验方法的局限性】

当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测限时可能会发生假阴性的结果。

【产品性能指标】

最低检测限：200 copies/mL；

【注意事项】

开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

1. 整个检测过程应严格分在三区进行：PCR 反应体系的配制区；标本处理、加样区；PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台，并进行消毒。

2. 使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。

3. 试剂准备和标本处理应使用超净工作台(负压式)或防污染罩，以防止对环境污染。

4. 每次实验应设置阴、阳性对照品。

5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。

6. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸或 75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。

7. 实验中接触过标准品和对照品的废弃物（如吸头）、扩增完毕的离心管、标本等应进行无害化处理后方可丢弃。

8. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。

9. PCR 反应混合液应避免光保存。

10. 反应管中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧。

11. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

[1]Outbreaks of disease suspected of being due to human monkeypox virus infection in the Democratic Republic of Congo in 2001.[J]. Journal of clinical microbiology, 2002.

[2]Kurt, D, Reed, et al. The Detection of Monkeypox in Humans in the Western Hemisphere[J]. New England Journal of Medicine, 2004, 350(4).

[3] 猴痘防控技术指南（2022 版）.

【基本信息】

上海之江生物科技股份有限公司 邮编：201201

住所：上海市张江高科技产业东区瑞庆路 528 号 20 幢乙号 1 层、21 幢甲号 1 层
生产地址：上海市闵行区新骏环路 588 号 26 幢

电话：021-34680028 E-mail：river@liferiver.com.cn
传真：021-34680010 网址：www.liferiver.com.cn

【说明书批准及修改日期】2022-7-26