

团 体 标 准

T/WEB10 0002—2024

人呼吸道合胞病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

Real-time fluorescent RT-PCR detection method for human respiratory syncytial virus

2024 - 12 - 30 发布

2024 - 12 - 30 实施

武汉东湖国家自主创新示范区生物医药行业协会 发 布

目 次

前言 II

1 范围 1

2 规范性引用文件 1

3 术语和定义 1

4 缩略语 1

5 生物安全要求 1

6 防污染要求 2

7 主要仪器 2

8 主要试剂 2

9 检测程序 2

10 结果判断 4

附录 A（资料性） 操作流程示意图 6

前 言

本文件按照GB/T 1.1—2020《标准化工作导则 第1部分：标准化文件的结构和起草规则》的规定起草。

请注意本文件的某些内容可能涉及专利，本标准的发布机构不承担识别这些专利的责任。

本文件由中国科学院武汉病毒研究所提出。

本文件由武汉东湖国家自主创新示范区生物医药行业协会归口。

本文件起草单位：中国科学院武汉病毒研究所、湖北省妇幼保健院、华中科技大学同济医学院附属协和医院、中华人民共和国广州海关技术中心、湖北省疾病预防控制中心。

本文件主要起草人：邓菲、杨娟、苏正元、付杰、白源、张丹娜、沈姝、唐霜、吴春晨、郑昕、师永霞、徐军强、李翔、殷强玲。

人呼吸道合胞病毒实时荧光 RT-PCR 检测方法

1 范围

本文件规定了人呼吸道合胞病毒实时荧光RT-PCR检测的术语和定义、缩略语、生物安全要求、防污染要求、主要仪器、主要试剂、检测程序、结果判断。

本文件适用于临床样本咽拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽取物或呼吸道抽取物、深咳痰液、诱导痰液、支气管冲洗液、肺泡灌洗液和病毒培养物中的人呼吸道合胞病毒实时荧光RT-PCR的检测。

2 规范性引用文件

下列文件中的内容通过文中的规范性引用而构成本文件必不可少的条款。其中，注日期的引用文件，仅该日期对应的版本适用于本文件；不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

GB 19489 实验室生物安全通用要求
GB/T 42066 急性病毒性感染呼吸道样本采集
WS/T 230 临床诊断中聚合酶链反应(PCR)技术的应用
WS/T 442 临床实验室生物安全指南
国卫科教发〔2023〕24号 人间传染的病原微生物目录

3 术语和定义

下列术语和定义适用于本文件。

3.1

人呼吸道合胞病毒 human respiratory syncytial virus, HRSV

一种含有包膜的RNA病毒，属肺炎病毒科(Pneumoviridae)人正肺病毒属(Human orthopneumovirus)。

3.2

实时荧光聚合酶链反应 real-time fluorescence polymerase chain reaction, real-time PCR

在 PCR 反应体系中引入荧光基团，利用荧光信号的积累实时监测整个 PCR 进程，通过连续监测绘制反应动力曲线，从而对样本中被扩增模板 DNA 的初始含量进行计算。该技术包含定性和定量检测，本标准定性检测。

3.3

反转录 reverse transcription, RT

以RNA单链为模板，在反转录酶催化下合成互补DNA（即cDNA）的过程。

4 缩略语

下列缩略语适用于本文件。

HRSV: 人呼吸道合胞病毒 (Human respiratory syncytial virus)

PCR: 聚合酶链式反应 (Polymerase chain reaction)

RT-PCR: 逆转录聚合酶链反应 (Reverse transcription polymerase chain reaction)

RNA: 核糖核酸 (Ribonucleic acid)

FAM: 6-羧基荧光素 (6-carboxyfluorescein)

Ct值: 循环阈值 (Cycle threshold)

ddH₂O: 双蒸水 (Double distilled water)

BSL-1: 生物安全一级实验室 (Bio-Safety Level 1)

BSL-2: 生物安全二级实验室 (Bio-Safety Level 2)

5 生物安全要求

5.1 根据《人间传染的病原微生物目录》规定，人呼吸道合胞病毒培养、未经培养的感染材料的操作应在BSL-2进行。

5.2 根据《人间传染的病原微生物目录》规定，灭活材料的操作、无感染性材料的操作可在BSL-1进行。

5.3 临床实验室应按WS/T 442要求进行风险评估。

6 防污染要求

6.1 实验室废弃物按照GB 19489处理。

6.2 PCR防污染措施按WS/T 230规定的要求进行。

7 主要仪器

7.1 荧光定量PCR仪。

7.2 二级生物安全柜。

7.3 超净工作台。

7.4 冰箱（4℃、-20℃、-70℃）。

7.5 高速冷冻离心机（最高离心力达12 000 g以上）。

7.6 移液器（10 μL、200 μL、1 000 μL）。

7.7 涡旋仪。

7.8 高压灭菌器。

7.9 核酸提取仪。

8 主要试剂

8.1 核酸提取试剂。

8.2 实时荧光RT-PCR试剂。

8.3 引物探针。针对N蛋白，设计引物探针序列如下：

RSV-qF 5'-GATGCWAATCATAAATTCACWGG-3'

RSV-qR 5'-GTATYTTTATRGTTCTTCYCTTCC-3'

RSV-P 5'-FAM-TAGGTATGYTATATGCTATGTCYAGRTT-BHQ1-3'

注：引物探针序列中简并碱基W代表A/T，Y代表C/T，R代表A/G。

9 检测程序

检测流程参照附录A执行。

9.1 样本采集

样本类型包括临床样本咽拭子、鼻咽拭子、鼻咽抽取物或呼吸道抽取物、深咳痰液、诱导痰液、支气管冲洗液、肺泡灌洗液和病毒培养物。样本采集所采用的器材，包括采集容器和拭子应为无菌、无DNase/RNase、一次性，所用材质与所含添加物不可抑制或干扰PCR检测过程。采集、保存及运输应符合GB/T 42066的相关要求。

9.1.1 咽拭子

用拭子适度用力擦拭双侧扁桃体及咽后壁，反复擦拭3次~5次，取出拭子时应避免触及舌部。将拭子头浸入采样液中，弃去尾部。

9.1.2 鼻咽拭子

将采样拭子垂直于鼻子（面部）方向插入鼻腔，使之与上颚平行，将采样拭子在鼻咽部位停留15 s~30 s，同时轻柔旋转2次~5次，边旋转边抽出采样拭子。

9.1.3 鼻咽抽取物或呼吸道抽取物

用与负压泵相连的收集器从鼻咽部抽取黏液或从气管抽取呼吸道分泌物。

9.1.4 深咳痰液

要求病人无菌生理盐水漱口后深咳痰液，将咳出的痰液收集于含3 mL采样液的采样管中。

9.1.5 诱导痰液

诱导前5 min给予200 μg ~400 μg 沙丁胺醇吸入。样本提供者在清水漱口、擤鼻后用3%的高渗盐水超声雾化吸入。雾化过程中，每隔10 min停止雾化，嘱样本提供者在清水漱口、擤鼻后，用力咳嗽，把所有口腔内容物吐到样本容器中。

9.1.6 支气管冲洗液

将收集器头部从气管内导管插入气管，注入5 mL生理盐水，接通负压，旋转收集器头部并缓慢退出，收集抽取的黏液，并用采样液冲洗收集器1次。

9.1.7 肺泡灌洗液

在灌洗的肺段经活检孔注入2%利多卡因1 mL~2 mL，做灌洗肺段局部麻醉。将支气管镜顶端紧密楔入目标气管段或亚段支气管开口处。经操作孔道快速注入灭菌生理盐水（室温或37 $^{\circ}\text{C}$ 预热），每次注入20 mL~50 mL，立即用6.6 kPa~13.3 kPa（50 mmHg~100 mmHg）负压吸引回收灌洗液，总量60 mL~120 mL。

9.1.8 病毒培养物

细胞来源的培养物，5000 rpm 离心5分钟，取上清；动物来源的培养物，将组织制备成适当大小的块状，4000 rpm研磨10 s，间隔10 s重复3次，最后5000 rpm，4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心5 min，取上清。

9.2 样本的运送和保存

9.2.1 样本采集后应存放在2 $^{\circ}\text{C}$ ~8 $^{\circ}\text{C}$ 的条件下，48 h内运送至实验室，如暂时不进行检测，应置于-70 $^{\circ}\text{C}$ 或以下温度保存，样本避免反复冻融。

9.2.2 痰液样本应先加入2 mL蛋白酶K（1 g/L），在55 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育15 min进行液化。采集的样本置于涡旋仪混匀，4000 rpm离心5 min后取200 μL 上清进行核酸提取。

9.3 核酸提取

9.3.1 柱提法（以Takara MiniBEST Viral RNA/DNA Extraction Kit（9766）为例），操作步骤如下：

- 吸取20 μL Proteinase K和1.0 μL Carrier RNA到1.5 mL无菌Eppendorf离心管中；
- 加入200 μL 样本（平衡到室温）到上述离心管中；
- 加入200 μL VGB到上述离心管中，回旋振荡15 s；
- 56 $^{\circ}\text{C}$ 孵育10 min；
- 加200 μL 乙醇（96~100%）到离心管中，盖上离心管帽，回旋振荡15s；
- 从离心管中吸取溶液（700 μL /次）至Spin Column中，注意不要滴到柱子边缘上，盖上离心管帽，12000rpm离心1 min，弃滤液；
- 重复步骤f直至所有溶液均经吸附柱Spin Column处理；
- 将吸附柱套到新套管中，加500 μL Buffer RWA至Spin Column中，盖上离心管帽，12000 rpm离心1 min，用移液器把吸附柱套管中的滤液吸出弃掉，将套管套回原吸附柱中；
- 加700 μL Buffer RWB至Spin Column中，盖上离心管帽，12000 rpm离心1 min，用移液器把吸附柱套管中的滤液吸出弃掉，请沿Spin Column管壁四周加入Buffer RWB，这样有助于完全冲洗沾附于管壁上的盐份；

注：请确认Buffer RWB中已经加入了指定体积的96-100%乙醇。

- 重复步骤i；
- 将Spin Column安置于Collection Tube上，12000 rpm离心2 min；

- l) 将吸附柱放入一个新的 1.5 mL 无 RNA 酶离心管中, 打开柱子帽, 加入 50 μL RNase free ddH₂O, 盖上盖子, 在室温孵育 5 min, 12000 rpm 离心 1 min;
- m) 提取的 RNA 模板可立即进行荧光定量 PCR 检测, 剩余 RNA 分装后贮存于 -70℃ 以下备复检。
- 9.3.2 人呼吸道合胞病毒核酸提取也可以采用等效 RNA 提取试剂及方法: 如采用自动化核酸提取仪和配套核酸提取试剂进行核酸提取; 推荐柱提法。
- 9.3.3 提取的核酸应及时进行实时荧光 RT-PCR 检测, 或 -70℃ 保存同时避免反复冻融。

9.4 核酸检测

9.4.1 实时荧光 RT-PCR 反应体系配置

- 9.4.1.1 在 PCR 体系配制区, 参照各检测试剂盒说明书配制 PCR 体系, 以 Takara One Step PrimeScript™ RT-PCR Kit (RR064A) 试剂盒为例, 反应体系详见表 1; 根据待检样本数量计算各成分体积, 按顺序足量加入各反应成分, 并充分混匀, 分装至 PCR 管或板, 每管或孔 20 μL ; 瞬时离心后, 转移至样本处理区。
- 9.4.1.2 在已分装有 PCR 反应混合液的 PCR 管或孔中分别加入提取好的样品核酸 5 μL , 盖上管盖, 混匀后瞬时离心, 将 PCR 管放入荧光 PCR 检测仪内, 记录样本放置顺序。

表 1 人呼吸道合胞病毒实时荧光 RT-PCR 检测反应体系

试剂	使用量 (μL)	终浓度
2× One Step RT-PCR Buffer III	12.5	
PrimeScript RT Enzyme Mix II	0.5	
TaKaRa Ex Taq HS (5 U/ μL)	0.5	
RSV-qF (20 μM)	0.25	0.2 μM
RSV-qR (20 μM)	0.25	0.2 μM
RSV-P (20 μM)	0.5	0.4 μM
样品核酸	5	
RNase Free ddH ₂ O	5.5	
Total	25	

- 9.4.1.3 反应体系中同时设置阳性对照、阴性对照, 阳性对照为含有呼吸道合胞病毒核酸的参考品, 阴性对照为不含呼吸道合胞病毒核酸的样本。
- 9.4.2 扩增程序
- 9.4.2.1 报告荧光 (Report Dye) 设定为 FAM, 淬灭荧光 (Quench Dye) 设定为 None, 校准荧光 (Reference dye) 设定为 None, 可根据不同品牌仪器说明等效设置参数。
- 9.4.2.2 以 BioRad CFX96-Touch 为例, 反应参数设置如下: 42℃/15 min; 95℃/1 min; 95℃/10 s, 52℃/1 min, 45 个循环; 在每次循环的 52℃ 退火延伸时收集荧光。试验结束后, 根据收集的 Ct 值和荧光曲线判定结果。
- 9.4.2.3 不同荧光 PCR 仪性能差异, 可根据情况适当调整 PCR 循环的温度和时间。

10 结果判断

10.1 基线和阈值设置

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照的检测荧光曲线的最高点, 也可根据仪器噪音情况适当调整。

10.2 质控标准

阴性对照无扩增曲线及Ct 值，同时阳性对照Ct值 ≤ 30 ，且有明显的扩增曲线，否则检测无效。

10.3 结果描述及判定

10.3.1 被检样本无 Ct 值，且无扩增曲线，判定为呼吸道合胞病毒核酸实时荧光 RT-PCR 阴性。

10.3.2 被检样本 Ct 值不大于 37，且有明显的扩增曲线，则判定为呼吸道合胞病毒核酸实时荧光 RT-PCR 阳性。

10.3.3 被检样本 Ct 值介于 37 和 45 之间时，需重复检测一次，如复测后 Ct 值仍介于 37 和 45 之间，且有明显的对数增长期，则判定呼吸道合胞病毒核酸实时荧光 RT-PCR 阳性；否则建议采取浓缩方式处理核酸样本，再重复检测，如重新检测 Ct 值有明显减少趋势，且曲线有明显的对数增长期，判定为呼吸道合胞病毒核酸实时荧光 RT-PCR 阳性；否则判定为呼吸道合胞病毒核酸实时荧光 RT-PCR 阴性。

10.4 注意事项

10.4.1 本检测方法的最低检出限为 500 copies/mL，按照推荐的试剂和仪器检测，对应的 Ct 值在 37 左右，当样本中核酸含量低于该值时可能发生假阴性的结果。

10.4.2 实验室污染，试剂污染，样本交叉污染会导致假阳性结果出现；试剂运输、保存不当或试剂配置不准确引起的检测体系效能下降，可能导致假阴性结果出现。

附录 A
(资料性)
操作流程示意图

A.1 图A.1给出了人呼吸道合胞病毒实时荧光RT-PCR检测的操作流程示意图。

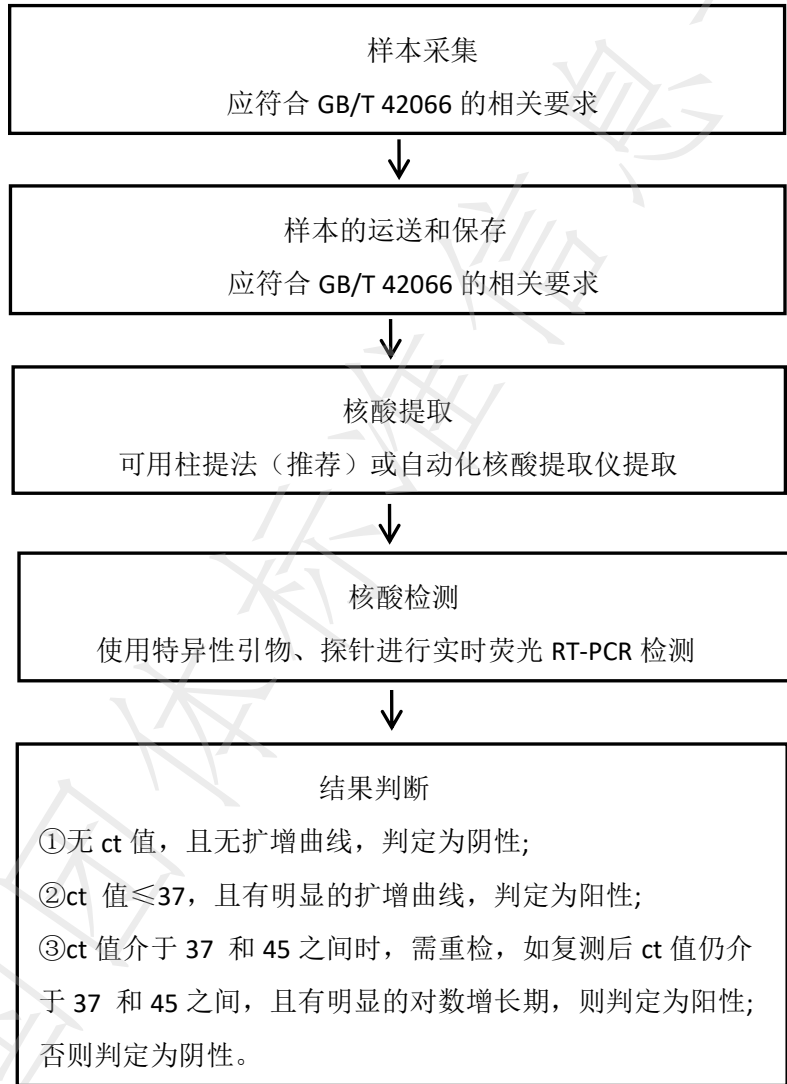


图 A.1 操作流程示意图