

腺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：腺病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测人咽拭子样本中的腺病毒（Adenovirus）核酸。

本产品已在临床试验中已经验证能检出的腺病毒亚型有 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型、7 型和 55 型。本产品用于对疑似腺病毒感染（如发热、咳嗽、喘息、呼吸困难、支气管炎、上呼吸道感染、肺部感染等）患者或相关的密切接触者的腺病毒核酸检测，检测结果可用于腺病毒感染的辅助诊断，为腺病毒感染提供分子诊断依据。阴性结果不能排除腺病毒感染，阳性结果不排除检测指标外细菌感染或其他病毒混合感染情况，检测结果仅供临床参考，不得作为临床诊断的唯一标准。使用本产品的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。

根据宿主范围不同，腺病毒分为哺乳动物腺病毒属(Mastadenovirus)和禽类腺病毒属(Aviadenovirus)。人腺病毒(Human adenoviruses, HAdV)属于腺病毒科(Adenoviridae)，根据免疫学、生物学、生物化学特性不同，将其分为 A~G 7 个亚种，共有 52 个血清型，不同的血清型有不同的器官亲和性并引起相应的临床表现，对呼吸道、胃肠道、尿道和膀胱、眼、肝脏等均可感染，与呼吸道感染相关的 HAdV 主要有 B 亚属 (HAdV-3、7、11、14、16、21、50、55 型)，C 亚属 (HAdV-1、2、5、6、57 型) 和 E 亚属 (HAdV-4 型)。腺病毒肺炎约占社区获得性肺炎的 4%-10%，重症肺炎以 3 型及 7 型多见。人腺病毒呼吸道感染可经飞沫传播、接触传播，人群普遍易感，呼吸道腺病毒感染后主要表现为隐性感染、急性上呼吸道和下呼吸道感染。多数患者以急性上呼吸道感染为主，表现为急性发热起病，同时伴咳嗽、咳痰、咽部不适、咽痛等；可出现腹泻、乏力、恶心、食欲减退等消化系统症状；少数患者出现头痛、头晕。少数可发展为重症肺炎，甚至死亡。

实验室诊断方法目前主要有呼吸道标本中的病毒分离培养、特异性核酸检测、特异性抗原阳性检测，以及急性期与恢复期双份血清标本特异性 IgG 抗体检测。

【检验原理】

本试剂盒通过“核酸提取或纯化试剂”或通过“样本释放剂”提取、纯化呼吸道样本中的腺病毒 DNA，采用 PCR-荧光探针法检测提取、纯化后的腺病毒 DNA。利用针对腺病毒 Hexon gene 和 Penton gene 片段（长度分别为 97nt 和 129nt）的高度保守区设计的特异性引物和 FAM 荧光基团标记的特异荧光探针，配以 PCR 反应液等组分，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现腺病毒 DNA 的快速检测。

PCR 检测体系含有 UNG 酶+dUTP 防污染措施，将可能的产物污染充分降解，避免假阳性结果。

PCR 检测体系含有阳性内对照（即内标，内标探针采用 HEX 荧光基团标记），通过检测内标是否正常来监测待测样本中是否具有 PCR 抑制物，避免 PCR 假阴性。

PCR 检测体系含有内参比荧光 ROX，用于校正加样误差和管间差异，便于仪器自动分析报告荧光与内参比荧光 ROX 的比值。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下组分组成：

序号	试剂名称	规格与装量	主要组成及浓度
1	腺病毒-内标	50μL/管×1 管	内标质粒
2	腺病毒-阳性对照	0.5mL/管×1 管	灭活的腺病毒样本，浓度为 4.00E+03copies/mL
3	腺病毒-阴性对照	0.5mL/管×1 管	生理盐水
4	腺病毒-酶混合液	96μL/管×1 管	Taq 酶 (4.5U/μL)、UNG 酶 (0.1U/μL)
5	腺病毒-PCR 反应液	912μL/管×2 管	10×PCR buffer、dNTPs、引物、探针、灭菌纯化水

备注：1) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。

2) 关于质控品的处理：阴、阳性对照操作处理同待测样本。

3) 试剂盒内的生物样本均已经过灭活处理。

4) 使用本公司生产的样本释放剂（湘长械备 20150022 号）或核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）进行核酸提取。

5) 自备耗材：带有聚丙烯纤维头的无菌拭子，体积大于 1mL 的采样管，灭菌生理盐水。

【储存条件及有效期】

-20±5°C 避光密闭储存，有效期为 12 个月。

生产日期，失效日期请见外包装盒。

1. 不使用时，这些试剂在包装标识的效期内可稳定存放。一旦使用，试剂盒反复冻融应不超过 5 次。
2. 采用泡沫箱加蓄冷剂运输 5 天，温度不超过 8°C，不会影响产品效期。

【适用仪器】适用于 ABI7500 实时荧光 PCR 仪、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪、宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：咽拭子
2. 样本采集：尽量采集病人发病 3 日内的标本，用无菌拭子拭取双侧咽扁桃体及咽后壁，将拭子置入含 1mL 生理盐水的无菌采样管中，弃去拭子尾部，将采样管盖紧后，密闭送检。
3. 样本保存和运送：上述采集的样本应尽快用于检测，建议样本保存在 2-8°C 不超过 48 小时，-20±5°C 保存 10 个月，-70°C 或以下可保存 12 个月，应避免反复冻融。标本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。适用于本试剂的样本在提取核酸后，应尽快完成检测，如需要先保存再检测，推荐保存条件为：2-8°C 保存不超过 36 小时，-20±5°C 保存不超过 72 小时。

【检验方法】

ABI7500 实时荧光 PCR 仪、Life Technologies QuantStudio™ 5 荧光 PCR 仪、宏石 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪参照以下方法进行检验：

1.1 试剂准备（在试剂准备区进行）

- 1.1.1 取出试剂盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温，混匀后备用；
- 1.1.2 根据待测样本、阴性对照、阳性对照，按比例（腺病毒-PCR 反应液 38μL/人份+腺病毒-酶混合液 2μL/人份+腺病毒-内标 1μL/人份）取相应量的 PCR 反应液、酶混合液以及内标（如使用核酸提取或纯化试剂提取样本核酸，内标参与提取，反应液中无需再加内标），充分混匀成 PCR 混合液，2000rpm 离心 10 秒，4°C 避光待用。

1.2 样本处理与加样（在样本处理区进行）（阴、阳性对照与待测样本同步处理）

1.2.1 样本处理

处理方法 1：取 200μL 待测样本到 1.5mL 离心管，使用圣湘生物科技股份有限公司的“核酸提取或纯化试剂”（湘长械备 20150021 号）按其说明书操作进行核酸提取，最后加入 50μL 洗脱液进行洗脱。本试剂盒中的腺病毒-内标需加入提取或纯化试剂盒中的提取溶液 1 中参与提取，用量为 1μL/人份。

处理方法 2：取 500μL 待测样本到 1.5mL 离心管，使用圣湘生物科技股份有限公司的“样本释放剂”（湘长械备 20150022 号）按其说明书操作进行核酸提取，最后加入 50μL 核酸释放剂进行洗脱。

1.2.2 加样

- 1.2.2.1 根据待测样本、阴性对照、阳性对照的数量，每个反应管加入 40μL PCR 混合液。
- 1.2.2.2 在装有 PCR 混合液的反应管中分别对应加入上述前处理的阴性对照、阳性对照和待测样本（吸打混匀后吸取）各 10μL，盖上管盖（如有气泡，可用手指弹击，去除气泡），2000rpm 离心 10 秒或用手轻甩至管壁无明显液珠。

1.3 PCR 扩增（在扩增与分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

- 1.3.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照以及未知样本，并设置样本名称。
- 1.3.2 荧光检测通道选择（以 ABI 7500 仪器为例）：1) 选择 FAM 通道（Reporter: FAM, Quencher: none）检测腺病毒 DNA；2) 选择 HEX 或 VIC 通道（Reporter: HEX/VIC, Quencher: none）检测腺病毒内标；3) 参比荧光（Passive Reference）：选择 ROX。设置 Sample Volume 为 50。

1.3.3 循环参数设定：

步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50°C	2 分钟
2	Taq 酶活化	94°C	5 分钟
3	变性	94°C	15 秒
			45

	退火, 延伸, 及荧光采集	57°C	30 秒*	
4	仪器冷却 (可选)	25°C	10 秒	1

(*注: 由于 ABI7500 仪器原因, 不能设置为 30 秒, 可以设置为 31 秒或 32 秒。)

设置完毕, 保存文件, 运行反应程序。

2. 结果分析 (请参照各仪器使用说明书进行设置)

反应结束后自动保存结果, 根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值 (用户可根据实际情况自行调整, Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20, 调整阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线), 点击 Analyze 进行分析, 使各项参数符合下述“3. 质量控制”中的要求, 然后到 Plate 窗口下记录 Ct 值。

3. 质量控制

3.1 腺病毒-阴性对照: FAM 检测通道曲线无 Ct 值显示; 但内标 (HEX/VIC) 检测为阳性, 且 Ct 值 $\leq$ 40。

3.2 腺病毒-阳性对照: FAM 检测通道有明显 S 型扩增曲线, 且检测 Ct 值小于 35。

3.3 以上要求需在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 需重新进行。

【阳性判断值】

通过检测来源于不同地区 86 份临床腺病毒阳性咽拭子样本、110 份临床阴性咽拭子样本, 进行 ROC 统计分析; 并结合 48 份用生理盐水稀释至 200copies/mL 的临床样本参考值情况, 确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 40。根据 110 份临床阴性咽拭子样本内标检测 Ct 值近似服从正态分布, 计算 99%参考值范围的上限值, 确定检测内标的 Ct 阳性判断值为 40。

【检验结果的解释】

- 对于 FAM 通道测定 Ct 值 $\leq$ 40 的样本, 报告为腺病毒 DNA 阳性。
- 对于 FAM 通道测定 Ct 值 $>$ 40 的样本, 同时, 若 HEX/VIC 通道测定 Ct 值 $\leq$ 40, 内标为阳性, 可以判断核酸的提取、纯化和 PCR 扩增反应体系有效, 报告注明腺病毒 DNA 低于试剂盒检测下限; 若 HEX/VIC 通道测定 Ct 值 $>$ 40 或无显示, 内标为阴性, 可以判断核酸的提取、纯化和/或 PCR 扩增反应体系失效, 则该样本的检测结果无效, 应查找并排除原因, 并对此样本进行重复实验 (若重复试验的检测结果仍无效, 请与本公司联系)。

【检测方法的局限性】

样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关, 其中任何失误都将会导致结果不准确。如果样本处理时没有控制好交叉污染, 可能出现假阳性结果。本试剂盒检测是针对病原体的保守区, 但不排除病原体在流行过程中的基因突变可能导致假阴性结果。待检核酸序列可能长时间出现在体内, 而与病毒活性无关, 核酸检测阳性并不一定意味着目前感染了相应病毒或其为临床症状的致病因子。在不同病程、不同阶段样本的阳性率不一致。取标本期间, 接种减毒活疫苗的患者可能会导致检测试剂检测结果呈阳性。临床阳性和阴性预测值很大程度上取决于流行率, 对腺病毒的检验性能可能随检测流行率和检测人群变化。本试剂检测结果应结合患者临床症状及其他相关医学检查结果进行综合分析, 不得单独作为患者管理的依据。

【产品性能指标】

本试剂盒的检测灵敏度为 2.00×10^2 copies/mL; 本试剂盒检测企业工作参考品, 阴、阳性符合率均为 100%; 精密度试验: 对腺病毒中浓度阳性样本、临界阳性样本和阴性样本进行重复检测, 统计批内和批间、日内和日间精密度, 检测阴性样本均为阴性, 阳性检测结果 Ct 值的变异系数均 $\leq$ 5%; 干扰物质参考品检测表明, 常见的内源性干扰物质如纯化粘蛋白 (20 μ g/mL)、血红蛋白 (200 μ g/mL) 等以及常见的治疗呼吸道感染的药物在正常的使用剂量浓度下 (见下表 1) 对本试剂无干扰; 与常见呼吸道病原体 (肺炎支原体、肺炎衣原体、甲型流感病毒、呼吸道合胞病毒、柯萨奇病毒、巨细胞病毒、乙型流感病毒、人鼻病毒、偏肺病毒、肠道病毒 71 型、冠状病毒 229E、麻疹病毒、腮腺炎病毒、风疹病毒、金黄色葡萄球菌、大肠埃希氏菌、铜绿假单胞菌、I 型人副流感病毒、III 型人副流感病毒、博卡病毒、单纯疱疹病毒 1 型、水痘带状疱疹病毒、EB 病毒、百日咳杆菌、棒状杆菌属、流感嗜血杆菌、乳酸杆菌属、嗜肺军团菌、卡他莫拉菌、奈瑟氏菌属、表皮葡萄球菌、肺炎链球菌、化脓性链球菌、唾液链球菌、肺孢子菌、白念珠菌、肺炎克雷伯菌等) 无交叉反应。

表 1. 已验证无干扰的常见干扰物质

抑制物名称	终浓度	抑制物名称	终浓度
纯化粘蛋白	20 μ g/mL	血红蛋白	200 μ g/mL
苯福林	125 μ g/mL	盐酸组胺	200 μ g/mL
羟甲唑啉	50 μ g/mL	鼻内活流感病毒疫苗	50 μ g/mL

氯化钠	60μg/mL	苯佐卡因	50μg/mL
倍氯美松	50μg/mL	薄荷脑	50μg/mL
地塞米松	50μg/mL	扎那米韦	100μg/mL
氟尼缩松	100μg/mL	利巴韦林	100μg/mL
曲安奈德	100μg/mL	奥司他韦	100μg/mL
布地奈德	320μg/mL	帕拉米韦	100μg/mL
莫米松	100μg/mL	莫匹罗星	50μg/mL
氟替卡松	200μg/mL	妥布霉素	50μg/mL

临床试验研究结果：本产品临床研究共入组样本 850 例，与上市的同类产品做对照，阳性一致性百分比为 99.09% (95% CI: 96.75%~99.89%)，阴性一致性百分比为 98.41% (95% CI: 97.10%~99.24%)，总一致性百分比为 98.59% (95% CI: 97.55%~99.27%)。本产品临床试验检测的阳性中包括 95 例腺病毒 3 型，94 例腺病毒 7 型，9 例腺病毒 1 型，8 例腺病毒 2 型，9 例腺病毒 4 型，4 例腺病毒 5 型，7 例腺病毒 55 型。两种核酸提取/纯化方法的同源样本对比试验共检测样本 168 例，检测结果一致性百分比为 99.40% (95% CI: 96.73%~99.99%)。与病原体分离培养鉴定方法比较研究了样本 40 例，两种方法符合率为 75.00% (95% CI: 58.80%~87.31%)。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。产品性能仅针对声称的适用样本类型及【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法（包括样本采集液等）进行了验证，其它样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。
2. 试验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
4. 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性口罩及手套并经常替换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
5. 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。

【参考文献】

- [1].David Metzgar, Miguel Osuna, Samuel Yingst, et al. PCR Analysis of Egyptian Respiratory Adenovirus Isolates, Including Identification of Species, Serotypes, and Coinfections of Species, Serotypes, and Coinfections. Journal of Clinical Microbiology, 2005, 43(11): 5743-5752.
- [2].P.Pring-Akerblom, T. Adrian, T. Kostler. PCR-based detection and typing of human adenoviruses in clinical samples. Res. Virol 1997, 148: 225-231.
- [3].Marjolein Damen, Rene Minnaar, Patricia Glasius. Real-Time PCR with an Internal Control for Detection of All Known Human Adenovirus Serotypes. Journal of Clinical Microbiology, 2008, 46(12): 3997-4003.
- [4].Kim P. Lauer, Isabel Llorente, Eric Blair, et al. Natural variation among human adenoviruses genome sequence and annotation of human adenovirus serotype 1. Journal of General Virology, 2004, 85: 2615-2625.
- [5].尚定昆, 申宝玲, 郑晓群. 细胞培养结合实时荧光 RT-PCR 法快速检测 7 型腺病毒感染. Chin J nosocomiol Vol, 18(4): 594-597.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：圣湘生物科技股份有限公司

住所：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876

售后服务单位名称：圣湘生物科技股份有限公司

联系方式：0731-88883176 传真号码：0731-88884876

生产地址：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

生产许可证编号：湘食药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】