

人类疱疹病毒 4 型 (EB) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法) 说明书

【产品名称】

人类疱疹病毒 4 型 (EB) 核酸检测试剂盒 (荧光 PCR 法)

【货 号】YJC60106N

【包装规格】试用装, 25 反应/盒, 50 反应/盒

【预期用途】

本试剂盒用于血清、血浆样本中, 人类疱疹病毒 4 型 (EB) 的核酸定性检测。本试剂盒仅用于临床辅助诊断, 不作为临床诊断的唯一依据。

EB 病毒 (Epstein-Barr virus, EBV) 即人类疱疹病毒 4 型 (Human herpesvirus 4) 属于疱疹病毒 γ 亚科淋巴病毒属, 具有显著的嗜淋巴细胞特性, 为线性双链 DNA 病毒。4 岁以下儿童 EBV 感染率高达 90% 以上, 绝大部分为无症状亚临床感染, 仅部分感染者临床上表现为传染性单核细胞增多症。EBV 感染引起的疾病涉及淋巴细胞增生性疾病、非淋巴细胞的恶性肿瘤和自身免疫性疾病 3 大类。已证实, EBV 感染是引发高发地区低分化鼻咽癌的致癌因子。主要传播方式为唾液传播, 多呈散发性, 亦可引起流行。实验室检测方法目前主要有血清学检测、核酸检测等。

【检验原理】

本试剂盒采用实时荧光 PCR 技术和水解探针技术在同一反应管中实现一种或多种病原体在核酸水平上的定性检测。操作简单, 全程不开盖减少污染, 仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线, 实现即时结果判断。

本试剂盒设置有内标, 内标为核糖核酸酶 P (RNaseP) 采用 VIC 荧光素标记, 通过内标对待测样本的采集、运输和提取过程中进行监控, 避免检测结果的假阴性。

【主要组成成分】

组份名称	规格/体积/数量		
	试用装	25 反应	50 反应
核酸扩增反应液	125 μ L $\times$ 1 管	313 μ L $\times$ 1 管	625 μ L $\times$ 1 管
人类疱疹病毒 4 型 (EB) 检测液	75 μ L $\times$ 1 管	188 μ L $\times$ 1 管	375 μ L $\times$ 1 管
阳性对照	25 μ L $\times$ 1 管	25 μ L $\times$ 1 管	50 μ L $\times$ 1 管
去 RNA 酶水 (空白对照)	250 μ L $\times$ 1 管	250 μ L $\times$ 1 管	250 μ L $\times$ 1 管

备注: 不同批号间的试剂不能互换。本试剂盒不包含但检测必需的配套提取试剂: 硕世生物公司的病毒核酸提取试剂盒 (货号: SDK60102、SDK60103、SDK60104、SDK60105 等), 凯杰公司的 QIAamp Viral RNA Mini Kit (货号: 52904、52906) 提取试剂盒提取核酸, 按试剂盒说明书操作。

【储存条件及有效期】

避光-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 贮存, 有效期 12 个月。开封后避光-20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 贮存, 对有效期没有影响; 冰袋低温运输 4 天、反复冻融 5 次对有效期没有影响。生产日期、有效期至: 见外包装盒。

【适用仪器】

ABI 7500、ViiATM7、QuantStudioTM 5、QuantStudioTM 6/7、Roche LightCycler[®]480、Bio-Rad CFX96TM、上海宏石 SLAN-96P/S 等荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 1 样本类型: 血清、血浆样本等。
- 2 采集方法:
 - i. 血清: 将采集的 2 ml 静脉血注入无菌的非抗凝采血管中, 取分离出的血清待提取核酸。
 - ii. 血浆: 将采集的 2 ml 静脉血注入无菌的抗凝采血管中, 取分离出的血浆待提取核酸。
- 3 保存方式: 样本采集后应及时检测, 2 $^{\circ}$ C-8 $^{\circ}$ C 保存 3 天内完

成检测, -20 $\pm$ 5 $^{\circ}$ C 保存期 4 个月, -70 $^{\circ}$ C 以下保存 12 个月。样本避免反复冻融, 冻融次数不能超过 5 次, 采用冰袋低温运输不能超过 3 天。

【检验方法】

1. 试剂准备 (试剂准备区)

取出试剂盒, 在室温下融化并振荡混匀后, 低速离心 10 秒, 计算需准备反应试剂反应数 (n=样本数+2 管对照)。每反应体系配制如下:

反应液配制表 (每反应)

反应液组份	加量 (μ L)/每反应
核酸扩增反应液	12.5
人类疱疹病毒 4 型 (EB) 检测液	7.5
总体积	20

计算上述各试剂的使用量, 加入一适当体积的离心管中, 充分混匀后, 按 20 μ L 的量分装到 n 个 PCR 反应管中。

2. 样本处理 (样本处理区)

2.1 核酸提取

取待测样本, 按核酸提取试剂盒说明书操作提取核酸。

2.2 加样

在上述准备好的 PCR 反应管中分别加入处理好的待测样本核酸、阳性对照、空白对照各 5 μ L, 终体积为 25 μ L/管, 盖紧管盖, 瞬时低速离心。

3. PCR 扩增检测 (核酸扩增区)

3.1 将反应管放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2 以 ABI7500 操作说明为例

3.2.1 循环参数设定

步骤		温度	时间	循环数
1	预变性	95℃	5 min	1 cycle
2	变性	95℃	10 s	45 cycles
	退火、延伸及检测荧光	58℃	30 s	
步骤 2 中 58℃时荧光检测，检测通道：FAM、VIC				

步骤 2 中 58 $^{\circ}$ C 时荧光检测, 检测通道: FAM、VIC

注: ABI7500 实时荧光 PCR 仪不选 ROX 校正, 淬灭基团选 None。

3.2.2 结果分析

ABI 7500: 反应结束自动保存结果, 根据分析后图像调节 BaseLine 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值 (可以根据实际情况自行调整, Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20, 调整空白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。

【阳性判断值】

1. 阳性: Ct $\leq$ 35 且曲线呈 S 型。
2. 阴性: Ct $>$ 38 或者未检出。

【检验结果的解释】

质量控制

通道	Ct 值	
	FAM 通道	VIC 通道
空白对照	UNDET	UNDET
阳性对照	Ct $\leq$ 30	Ct $\leq$ 30

结果判读

在仪器正常，阳性对照和空白对照均正常的情况下进行结果分析。

通道	病原体/基因	结果解释
FAM	人类疱疹病毒 4 型(EB)	1. 阳性：检测结果 $C_t \leq 37$ ，曲线呈S型且有明显指数增长期，判为对应病原体/基因阳性； 2. 阴性：检测结果 $C_t > 40$ 或未检出，此次结果判断为对应病原体/基因阴性。 3. 可疑：待测样本检测结果 $37 < C_t \leq 40$ 。此时应对样本进行重复检测，如重读实验结果 C_t 值仍然在37-40范围，曲线呈标准S型且有明显指数增长期，则断为对应病原体/基因阳性，否则判断为对应病原体/基因阴性。
VIC	内标	样本内标VIC通道检测结果应 $C_t \leq 37$ ，否则采样复测。当样本结果判读为阳性时，如内标 $C_t > 40$ 或未检出，结果仍可信。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒用于样本中核酸的定性检测。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. 有关假阳性结果的可能性分析

样本在运输、处理过程中发生交叉污染；实验环境有 PCR 产物等气溶胶污染；实验过程中使用的耗材、设备等受污染，均有可能导致假阳性结果。

3. 有关假阴性结果的可能性分析

不正确的样本采集、转运及处理；样本中病原体含量过低；病原体待测靶序列的变异或其他原因导致的序列改变；未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子等均有可能导致假阴性结果。

【产品性能指标】

- 最低检测限：500 copies/mL；
- 线性检测范围： $2 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ copies/mL；
- 特异性：与其感染部位相同或感染症状相似且常见的其它病原体（人腺病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、人类疱疹病毒3型、人类疱疹病毒6型、人类疱疹病毒7型、人类疱疹病毒8型、巨细胞病毒、肠道病毒、链球菌）以及人类白细胞的总核酸无交叉反应。
- 精密度：检测精密度参考品的变异系数小于 5%。

【注意事项】

- 本试剂盒仅供科研使用。操作人员应经过专业培训并具有一定经验。
- 为保证实验结果的准确性和可靠性请使用已校准的移液器，选用合格的一次性使用的PCR反应管、离心管、枪头等进行样本处理及配液等操作，所有用具应不含DNA酶和RNA酶。
- 实验请严格分区操作；各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后请立即清洁工作台。
- 本产品使用前应在室温充分融化，混匀并瞬时低速离心。
- 样本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
- 每次实验应设置空白对照和阳性对照。不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
- 待测样本尽可能新鲜，提取过程应严防DNA酶污染及操作不当导致的DNA降解。
- 70℃保存的DNA样本，加样前应在室温充分融化、混匀并瞬时低速离心后使用。
- 分装有反应液的反应管应扣盖或装入密封袋内再转移至样

本处理区。

10. 加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。

11. 反应液分装时尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，避免泄露污染仪器。

12. 扩增完毕取出反应管，密封在专用塑料袋内，丢弃于指定地点。

13. 实验中用过的枪头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同丢弃。

14. 工作台及各种实验用物品经常用10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。

15. 实时荧光 PCR 仪需经常校正和清洁载样板板孔。

16. 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。

【参考文献】

[1] EB病毒感染实验室诊断及临床应用专家共识[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2018(1):2-8.

[2] 临床基因扩增检验实验室管理办法. 卫办医政发[2010]194号。

【基本信息】

生产企业名称：江苏硕世生物科技股份有限公司

住所：江苏省泰州市药城大道 837 号

联系方式：电话 0523-86201616 传真 0523-86201617 邮编 225300 网址 www.bioperfectus.cn

售后服务单位名称：江苏硕世生物科技股份有限公司

联系方式：电话 0523-86201616 传真 0523-86201617 邮编 225300 网址 www.bioperfectus.cn

生产地址：泰州市开发区寺巷富野村、帅于村 A 幢（G19）第三层厂房与第三、第四层办研区，泰州市开发区寺巷富野村、帅于村 F 幢（G14 四楼办研区），泰州市医药高新区药城大道 837 号

【医疗器械生产许可证编号】苏药监械生产许20100121号

【说明书核准日期及修改日期】2023年01月01日