

【产品名称】

通用名称：EB 病毒核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

32 测试/盒、96 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人全血样本中 EB 病毒核酸。

EB 病毒属疱疹病毒γ 亚科淋巴内隐病毒属，又称人类疱疹病毒 4 型。EBV 所致疾病包括：传染性单核细胞增多症、非洲儿童淋巴瘤(即 Burkitt 淋巴瘤)和鼻咽癌等。EB 病毒的实验室检测有：1)病毒分离培养；2)血清学诊断；3)实时荧光定量聚合酶链反应等。本公司开发的试剂盒用于 EB 病毒感染的辅助诊断，本试剂盒结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒选用 EB 病毒保守的基因片段设计特异引物及特异 TaqMan 探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合。在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5' 端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3' 端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对 EB 病毒核酸的自动化检测。

试剂盒中的内标选用一对保守基因特异性引物，结合特异性探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5' 端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3' 端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，内标选用 VIC 通道，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

	组成	主要成分	规格
32 测试/盒	核酸提取液	Tris、EDTA、NaCl、NaOH、NP-40、Triton-100、Chelex-100	1.8mL×1
	10×红细胞裂解液	NH ₄ Cl、NaHCO ₃ 、EDTA-Na ₂	5 mL×1
	EB 病毒反应混合液	Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
	Taq 酶	Taq DNA 酶及抗体	28μL×1
	EB 病毒强阳性对照	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值为 10 ⁶ copies/mL	100μL×1
	EB 病毒临界阳性对照	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值为 10 ³ copies/mL	100μL×1
	阴性对照	主要成分为 NaCl	100μL×1
	定量标准品 1#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁴ copies /mL	20μL×1
	定量标准品 2#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁵ copies /mL	20μL×1
	定量标准品 3#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁶ copies /mL	20μL×1
	定量标准品 4#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁷ copies /mL	20μL×1
	组成	主要成分	规格
96 测试/盒	试剂 I 核酸提取液	Tris、EDTA、NaCl、NaOH、NP-40、Triton-100、Chelex-100	4.8mL×1
	10×红细胞裂解液	NH ₄ Cl、NaHCO ₃ 、EDTA-Na ₂	15 mL×1
	EB 病毒反应混合液	Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP、引物、荧光探针	3.4mL×1
	Taq 酶	Taq DNA 酶及抗体	76.8μL×1
	EB 病毒强阳性对照	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值为 10 ⁶ copies/mL	300μL×1
	EB 病毒临界阳性对照	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值为 10 ³ copies/mL	300μL×1
	试剂 II 阴性对照	主要成分为 NaCl	300μL×1
	定量标准品 1#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁴ copies /mL	60μL×1
	定量标准品 2#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁵ copies /mL	60μL×1
	定量标准品 3#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁶ copies /mL	60μL×1
	定量标准品 4#	含 EBV 基因组 DNA(重组克隆)；浓度值(1~8)×10 ⁷ copies /mL	60μL×1

注：1. 定量标准品具体标值参见说明书内指示，不同批号试剂盒中各组分不可以互换

2. 核酸提取方法采用煮沸法。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，试剂反复冻融三次后，-20℃±5℃下可保存 30 天；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，模拟运输实验表明，运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器为具有 FAM 和 HEX/VIC 荧光通道的 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、TL988-IV 实时荧光定量 PCR 仪、Gentier96E 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier96R 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier48E 全自动 PCR 分析系统。

【样本要求】

1. 标本：全血。
2. 全血采集：全血用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 3~5mL，注入含 EDTA 抗凝剂的玻璃管，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血充分混匀。
3. 存放：标本可立即检测；2~8℃保存应不超过 48 小时；-20℃±5℃下保存不超过 3 个月；-70℃下长期保存，但应避免反复冻融。
4. 运输：采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】
 - 1.1 取 10×红细胞裂解液加入 9 倍体积的无菌去离子水稀释成 1×红细胞裂解液；
 - 1.2 1.5mL 离心管，加入抗凝血 500μL；
 - 1.3 加入 1000μL 的 1×红细胞裂解液，颠倒混匀，室温静置 5 分钟；
 - 1.4 室温下离心，5000rpm 离心，5 分钟，弃上清，保留沉淀；
 - 1.5 加入 500μL 的 1×红细胞裂解液，颠倒混匀，室温静置 5 分钟；
 - 1.6 室温下离心，5000rpm 离心，5 分钟，弃上清，保留沉淀，尽可能吸除残存液体；
 - 1.7 沉淀中加入 50μL 核酸提取液(内含固体沉淀颗粒物，为使颗粒均匀分布，每次取样时请用吸头反复吸打)，混匀后 2000rpm 离心 10 秒，100℃水浴或干浴 10 分钟，12000rpm 离心 10 分钟，上清供 PCR 扩增用(如样本裂解产物当天不使用，请于-20℃±5℃保存)；
2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中取出 EB 病毒反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒。计算需准备反应试剂测试数[n=样本数+对照数(3)+定量标准品数(4)]。每测试反应体系配制如下：

试剂	EB 病毒反应混合液	Taq 酶
用量	35.2μL	0.8μL

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 36μL 量分装到 PCR 反应管中，转移至样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

单个反应总体积为 40μL，因此往上述分装有 36μL 反应液的 PCR 薄壁管中按顺序分别加入 4μL 的阴性对照、EB 病毒强阳性对照、EB 病毒临界阳性对照和定量标准品 1#~4#(无需提取)以及样品处理上清液，盖紧反应管，转移至检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步骤	循环数	温度	时间
1	1	95℃	3min
2	40	94℃	15sec
		60℃	30sec(收集荧光)

检测荧光选择：检测样本(FAM)，内标(HEX/VIC)

5. 质量控制

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。阈值范围一般为 0.001~0.1 之间，强阳性对照 Ct 值应小于 25，临界阳性对照 Ct 值应在 30~35 之间，阴性对照 Ct 值无数据。标准曲线线性相关系数 $|r| \geq 0.98$ ，在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

【阳性判断值】EB 病毒阳性判断：FAM 通道检测 Ct ≤ 38，则判断该样本为 EB 病毒阳性。

【检验结果的解释】

1. 阴性样本：FAM 通道的 Ct 值无数据且内标 VIC 通道的 Ct 值 < 40。
2. 检测样本 FAM 通道的 Ct 值 ≤ 38，该样本可均判定为阳性，其中：
 - a. 检测样本测定值在 $1.0 \times 10^3 \text{copies/mL} \leq \text{EBV DNA} \leq 1.0 \times 10^8 \text{copies/mL}$ 范围内，测定结果有效，可直接报告定量结果。
 - b. 检测样本 FAM 通道的 EBV DNA $> 1.0 \times 10^8 \text{copies/mL}$ 时，应做适当稀释，使其落入有效范围内。
 - c. 检测样本 FAM 通道的测定值 $< 1 \times 10^3 \text{copies/mL}$ 时，参考 Ct 值作定性判断。
3. 如果样本 FAM 通道的 Ct 值 > 38，且内标 VIC 通道的 Ct 值 < 40，建议重做，重复测试如果 Ct 值 < 40 则判为阳性；若重复测定 Ct 值无数值则判为阴性；若检测过程中内标测定无数值，应当排查原因，重复对该样本检测。

【检验方法的局限性】

1. 本检验方法不能作为临床确诊的依据。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. 实验区域污染、气溶胶污染有可能造成假阳性结果。
3. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
4. 样本中的被检物浓度低于检测限时，有可能造成假阴性的结果。
5. 本试剂盒适用于使用 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、TL988-IV 实时荧光定量 PCR 仪、Gentier96E 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier96R 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier48E 全自动 PCR 分析系统五种荧光定量检测系统对 EB 病毒核酸的检测，其他仪器尚无可靠实验数据，请谨慎使用。

【产品性能指标】

1. 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管或离心管无破损，标签完好。
2. 分析特异性：8 份阴性参考品 N1~N8，检验结果均应为阴性，符合率(-/-)为 8/8。
3. 阳性参考品符合率：8 份阳性参考品 P1~P8，检验结果均应为阳性，符合率(+/-)为 8/8。
4. 线性：
 - 4.1 样本线性： $1.0 \times 10^3 \text{copies/mL} \sim 1.0 \times 10^8 \text{copies/mL}$ 范围内线性参考品相关系数 $|r| \geq 0.98$ 。
 - 4.2 定量标准品线性：4 份定量标准品，其定量检测的线性相关系数 $|r| \geq 0.98$ 。
5. 准确性：5 份参考品，每份参考品进行 3 次定量检测，其结果的均值应在 L1~L5 规定浓度范围内。
6. 检测限：浓度为 500copies/mL 的检测限参考品 L，重复检测 25 次后，至少 22 次检验结果应为阳性，检出结果符合率 $\geq 22/25$ 。
7. 精密度试验：选用 2 例高、低浓度样本作为精密度样本，每例重复测试 10 次，浓度检出值对数值的变异系数(CV%) $\leq 5\%$ 。
8. 干扰物：选用三份临床医院收集的样本，分为两组，一组分别添加 500mg/mL 的游离血红蛋白、18mM 甘油三酯和 0.8mg/mL EDTA 抗凝剂干扰物，检测结果的浓度值的对数值记为 M，另一组不添加干扰物作为对照，检测结果的浓度值的对数值记为 F，两者相对偏差 B 不超过 ± 0.5 个对数数量级。
9. 本试剂盒与人巨细胞病毒(HCMV)、单纯疱疹病毒 II 型(HSV II)、人类白细胞抗原 B27(HLA-B27)样本无交叉反应。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
4. 实验室严格分区操作：第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂；第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理；第三区：PCR 扩增区-PCR 扩增检测。
5. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
6. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
7. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
8. 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。
9. 扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
10. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
11. 工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
12. PCR 反应混合液应避免低温保存。
13. 不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. Fellner MD1, et al. Duplex realtime PCR method for Epstein-Barr virus and human DNA quantification: its application for post-transplant lymphoproliferative disorders detection. 2014;18(3):271-280
5. Hill CE, Harris SB, Culler EE, Zimring JC, Nolte FS, Caliendo AM. Performance characteristics of two real-time PCR assays for the quantification of Epstein-Barr virus DNA. Am J Clin Pathol. 2006;125:665-71.24.
6. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026-1030.
7. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989;7:762-768.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式:0512-62525631 传真:0512-62956337 网址:www.medtl.cn

售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司

联系方式:0512-62525631 传真:0512-62956337 网址:www.medtl.cn

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 (NW-07) 501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋 (NW-06) 504 室

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20153402134

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2020.07.22

修改日期：2021.03.12