

【产品名称】

通用名称：人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒（PCR-荧光法）

【包装规格】20 人份/盒（单管单人份）；20 人份/盒（非单管单人份）。

【预期用途】

本品用于器官移植、骨髓移植及 HIV 阳性/AIDS 患者尿液、乳汁、血清或淋巴细胞中的人巨细胞病毒（HCMV）核酸的定量检测。
本品用于人巨细胞病毒感染的辅助诊断和疗效监控，不用于血源筛查。检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本品选取人巨细胞病毒株（即人疱疹病毒 5 型）- AD169 基因组中编码即刻早期转录调节蛋白的 IE1 基因的一高度保守的非编码区为扩增靶区域，设计特异性引物及荧光探针，扩增片段长度为 86bp，利用实时荧光定量 PCR 技术，定量检测尿液、乳汁、血清或淋巴细胞样本中人巨细胞病毒 DNA。

【主要组成成分】

20 人份/盒（单管单人份）

试剂名称		规格	组成成分	数量
核酸提取试剂	DNA 提取液	500μL/管	去污剂和 Tris 盐酸缓冲液	2 管
PCR 试剂	HCMV-PCR 反应管		HCMV 特异引物探针、酶系和 Tris 盐酸缓冲液	20 管
质控品	HCMV 阳性定量参考品（2×10 ⁸ copies/ml）	50μL/管	HCMV AD-169 标准株稀释液	1 管
	HCMV 弱阳性质控品	200μL/管	HCMV AD-169 标准株稀释液	1 管
	HCMV 强阳性质控品	200μL/管	HCMV AD-169 标准株稀释液	1 管
	阴性质控品	200μL/管	HCMV 阴性标本	1 管
	稀释液	500μL/管	无菌生理氯化钠溶液	1 管

20 人份/盒（非单管单人份）

试剂名称		规格	组成成分	数量
核酸提取试剂	DNA 提取液	500μL/管	去污剂和 Tris 盐酸缓冲液	2 管
PCR 试剂	HCMV PCR 反应液	800μL/管	引物、探针	1 管
	Taq 酶系	60μL/管	Taq 酶系	1 管
质控品	HCMV 阳性定量参考品（2×10 ⁸ copies/ml）	50μL/管	HCMV AD-169 标准株稀释液	1 管
	HCMV 弱阳性质控品	200μL/管	HCMV AD-169 标准株稀释液	1 管
	HCMV 强阳性质控品	200μL/管	HCMV AD-169 标准株稀释液	1 管
	阴性质控品	200μL/管	HCMV 阴性标本	1 管
	稀释液	500μL/管	无菌生理氯化钠溶液	1 管

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】保存于-20±5℃，有效期为 6 个月。试剂盒应避免反复冻融。试剂盒生产日期和有效日期见产品标签。

【适用仪器】单管单人份：PE GeneAmp 5700、ABI Prism 7000、ABI Prism 7700、LightCycler。

非单管单人份：ABI Prism 7500、LightCycler、Abbott m2000 system。

【样本要求】

1. 尿液或乳汁：取晨尿或成熟乳 1ml 于 1.5ml 的无菌离心管中，离心取沉淀即为标本。标本可立即用于测试，也可保存于-20℃待测，保存期为 6 个月。
2. 血清：用无菌注射器抽取受检者静脉血 1ml，注入无菌 1.5ml Eppendoff 管，4℃静置过夜。吸取上层血清（注意勿带入红细胞）至另一无菌 1.5ml Eppendoff 管，即为血清标本。标本可立即用于测试（48 小时以内），也可以保存于-20℃待测保存期为 6 个月。
3. 淋巴细胞：取静脉血（EDTA 抗凝）1ml，利用淋巴细胞分离液分离淋巴细胞即为标本。标本可立即用于测试，也可保存于 4℃待测，保存期为 24 小时。所有标本运送采用 0℃冰壶。

【检验方法】

1. 标本处理

- 1.1 尿液或乳汁：标本 12,000 rpm 离心 5 分钟，沉淀加 50μL DNA 提取液打匀。（提取液内含不溶于水的物质，取样时需用加样器充分混匀后吸取。如出现因吸头嘴部太细不能吸取或取样后堵塞吸头的现象，可先用洁净无污染的剪刀将吸头嘴部剪去一截） 100℃保温 10 分钟（误差不超过 1 分钟）。（为保证病毒颗粒充分裂解，可转至 4℃静置 8~12 小时）12,000 rpm 离心 5 分钟，取上清液（含病毒 DNA）2μL 做 PCR 扩增。
- 1.2 血清：用无菌注射器抽取受检者静脉血 1ml，注入无菌 1.5ml Eppendoff 管， 4℃静置过夜。吸取上层血清（注意勿带入红细胞）至另一无菌 1.5ml Eppendoff 管，即为血清标本。取 50μL 血清加 50μLDNA 提取液打匀，100℃保温 10 分钟，12,000 rpm 离心 5 分钟，取上清液（含病毒 DNA）2μL 做 PCR 扩增。
- 1.3 淋巴细胞：加入 1ml 生理盐水至装有 1ml 静脉血（EDTA 抗凝）的离心管中，沿管壁轻轻打入并轻微混匀。将此 2ml 混合血液沿试管壁缓缓加入到装有 2ml 淋巴细胞分离液的试管中，不能震荡和混匀。2500rpm，15 分钟离心后，用加样枪吸出中间的细胞层于离心管中，10,000rpm 离心 5 分钟，沉淀加 50μL DNA 提取液打匀。100℃保温 10 分钟，12,000 rpm 离心 5 分钟，取上清液（含病毒 DNA）2μL 做 PCR 扩增。
- 1.4 阴性质控品： 质控品加 50μL DNA 提取液打匀。100℃保温 10 分钟（误差不超过 1 分钟），12,000 rpm 离心 5 分钟，取上清液 2μL 做 PCR 扩增。

2 参考品稀释和处理

将 HCMV 阳性定量参考品（2×10⁸copies/ml）6,000rpm 离心数秒标示为 10⁸，另取 4 支灭菌新 0.5ml 离心管，分别加入 90μL 稀释液，依次标示为 10⁷~10⁴。吸取 10⁸ 管 10μL 至 10⁷管，用加样器反复混匀后换新吸头取 10μL 至 10⁶管，依此方法依次稀释至 10⁴管。-20℃保存；吸取 5 个（2×10⁸~2×10⁴copies/ml）的阳性定量参考品梯度和阴性质控品各 40μL，分别加 40μL DNA 提取液打匀，以下步骤同样本处理。上清液（含病毒 DNA）待用于 PCR 扩增。

3. PCR 扩增

ABI Prism 7000, PE GeneAmp 5700, ABI Prism 7500:

- 3.1 单管单人份：取 HCMV-PCR 反应管若干，分别加入处理后上清液（含病毒 DNA ）各 2μL，6,000rpm 离心 1 分钟。将各反应管放入定量 PCR 仪器的孔样品槽内，按对应顺序设置阴性质控品、阳性定量质控参考品梯度（应设置为 10⁸~10⁴copies/ml）以及未知标本，并设置样品名称、标记荧光基团种类和循环条件：93℃→2 分钟预变性，然后按 93℃ 45 秒→55℃ 60 秒，先做 10 个循环，最后按 93℃ 30 秒→55℃ 45 秒，做 30 个循环。

3.2 非单管单人份：按比例(HCMV PCR 反应液 40μL/人份+ Taq 酶 3μL/人份)取相应量的 HCMV PCR 反应液及 Taq 酶，充分混匀后按 43μL/管分装至 0.2ml 离心管中，备用。向准备好试剂的 0.2ml 离心管中，分别加入处理后的样品（包括标本、阴性质控品、HCMV 弱阳性质控品和 HCMV 强阳性质控品）上清液 2μL，或直接加 HCMV 阳性定量参考品 2μL，8,000rpm 离心数秒，放入仪器样品槽。

Roche LightCycler: 将处理后的样品（或阴阳性质控参考品）2μL 加入专用毛细管中，盖上 PCR 反应盖，8,000rpm 离心 2 分钟，插入圆形卡盘倒置 10 秒钟后放入仪器中设置循环条件：93℃→2 分钟预变性，然后按 93℃ 5 秒→57℃ 45 秒，做 40 个循环，37℃ 1 秒。所有设置全部完成后保存文件，最后运行程序。

Abbott m2000 system:

按比例(HCMV-PCR 反应液 40μL/人份+ Taq 酶 3μL/人份)取相应量的 HCMV PCR 反应液及 Taq 酶到 4mL Mastermix 管，充分混匀后打开螺口管盖，放置在 Abbott m2000 system 中，将相应数量的洁净 0.2mL PCR 八连排离心管放入 Abbott m2000 system 中，选择相应的分装程序，运行。程序运行完毕后，盖上 PCR 反应盖，8,000rpm 离心数秒，放入仪器样品槽。将带有 protocol 的 CD 光盘载入 system 计算机，安装扩增程序，在 Abbott m2000 system 中选择相应的“扩增”指令，将加完核酸的 PCR 反应管放入仪器样品槽，关闭仪器舱门，运行扩增程序。

4. 结果分析条件的设定

PE GeneAmp 5700、ABI Prism 7000、ABI Prism 7500 的条件设置：反应结束后保存检测数据文件。根据分析后图像调节 baseline 的 start 值（2~4），stop 值（7~9）以及 Threshold 值，使 Std curve 窗口下的标准曲线图达到最佳（correlation 数值介于-0.97~-1 之间，correlation 数值等同于 r 值），最后到 Reporter 窗口下记录仪器自动分析计算出的未知标本数值（Qty）。

Roche LightCycler 的条件设置：反应结束后自动保存检测数据文件，调整荧光记数值 (Fluorescence) 为 F1/F2，点击 Quantification 读取结果。调节噪声容限在阴性对照以上，要求在 Step3:Analysis 下相关性 r 值<-0.97，接近-1.0。并保证阴性对照 Ct 值不出现任何数值。最后记录仪器自动分析计算出的未知标本数值（M）。

Abbott m2000 system 的条件设置：分析条件无需设定，仪器自动分析计算出位置标本数值 (Qty)。

5. 质量控制

阴性质控品：全部阴性

HCMV 阳性定量参考品：全部阳性

|r| ≥0.97（correlation 数值等同于 r 值），

HCMV 弱阳性质控品数值范围：2.50×10⁴ 拷贝/ml ~4.0×10⁵ 拷贝/ml

HCMV 强阳性质控品数值范围：2.50×10⁵ 拷贝/ml ~4.0×10⁶ 拷贝/ml

以上要求需在同一次试验中同时满足。否则，本次试验无效，全部试验应重新进行。

【检验结果的解释】

1. 阴性结果判定：

ABI Prism 7000, PE GeneAmp 5700, ABI Prism 7500 仪器、Abbott m2000 system 仪器：如果增长曲线不是典型的 S 曲线或 Ct 值=30，则实验结果判为小于 10⁴copies/ml。

Roche LightCycler：如果增长曲线不是典型的 S 曲线或 Ct 值为空白，则实验结果判为小于 10⁴copies/ml。

2. 阳性结果判定与计算：

ABI Prism 7000, PE GeneAmp 5700 仪器, ABI Prism 7500 仪器、Abbott m2000 system 仪器：如果增长曲线呈典型的 S 曲线且 Ct 值<27，则实验结果判为阳性。样品的 HCMV DNA 含量（copies/ml）= Qty/20。

若样品为血清，则样品中的 HCMV DNA 含量（copies/ml）= Qty

Roche LightCycler：如果增长曲线呈典型的 S 曲线且 Ct 值<37，则实验结果判为阳性。样品的 HCMV DNA 含量（copies/ml）=M/20。若样品为血清，则样品中的 HCMV DNA 含量（copies/ml）=M

3. 对于检测结果阳性的报告，只表明该样本中有病毒的遗传物质 DNA 存在，并不表明有活病毒存在。

4. 虽然本试剂盒检测特异性、灵敏度均较高，但测定结果为阴性的并不能排除样本含有病毒，只能说明样本中含有的病毒浓度低于本试剂盒的检测灵敏度。

【产品性能指标】

1. 根据临床考核结果，本试剂盒的检出限度为 10⁴copies/ml。

2. 本检测系统的交叉反应性已经临床考核的检验而确定，EB、HPV6 型、HPV11 型、HSV-1、HSV-2 与本品无交叉反应，阳性结果可以排除疱疹病毒群中的其它属病毒。

3. 根据本品对临床确诊 HCMV 患者连续监测的结果：人巨细胞病毒感染后为持续性或间断性排毒，阴性结果不能排除人巨细胞病毒感染。需在不同的时间段同时取不同组织的样品以确证人巨细胞病毒 DNA 的存在。

【注意事项】

1. 实验前请仔细阅读本说明书；

2. 实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行（试剂准备区、标本制备区、扩增和产物分析区），所用消耗品应灭菌后一次性使用，PCR 操作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；

3. 为试剂和标本准备阶段提供负压超净工作台，实验过程中请穿工作服，带一次性手套，使用自卸管移液器；

4. 对每次实验进行质量控制；

5. 自备灭菌生理盐水；

6. 标本处理时“去上清”步骤，注意吸头不要碰触沉淀；

7. 试剂使用前要完全解冻，但应避免反复冻融；

8. 试剂盒 DNA 提取液内含不溶于水的物质，取样时需用加样器充分混匀后吸取。如出现因吸头嘴部太细不能吸取或取样后堵塞吸头的现象，可先用洁净无污染的剪刀将吸头嘴部剪去一截；

9. 加样时要加于反应管管壁上，然后务必离心，使样品与反应液充分混匀；

10. 为保证病毒颗粒充分裂解可转至 4℃静置 6~8 小时；

11. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；

12. 实验完毕用 10%次氯酸或 70%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。

13. 本试剂盒内的阳性定量质控品应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com

售后和服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：http://www.daangene.com

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号

【说明书核准日期及修改日期