

巨细胞病毒(CMV)核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】
通用名称：巨细胞病毒(CMV)核酸测定试剂盒（荧光 PCR 法）
【包装规格】 24 人份 / 盒、50 人份 / 盒、100 人份 / 盒。
【预期用途】 本试剂盒对人血清、血浆或尿液中巨细胞病毒核酸（CMV DNA）进行定量检测。
巨细胞病毒的感染途径主要为接触、输血、宫内和产道等，感染较常见于胎儿、新生儿、孕妇等，孕妇感染可致新生儿先天畸形。当机体免疫缺陷或免疫系统处于抑制状态下，极易受 CMV 感染，如器官移植后接受免疫抑制治疗、恶性肿瘤化疗后、艾滋病患者等，这些患者一旦感染，常致较高的死亡率和严重的疾病。本试剂盒通过检测 CMV-DNA 水平，以监测病毒活跃程度，对监测器官移植、免疫缺陷患者、抗肿瘤治疗中 CMV 的感染，预测 CMV 疾病的发生、发展及预后，观察抗病毒治疗的效果具有一定的临床意义。
【检验原理】 本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）技术结合荧光探针技术，对巨细胞病毒特异性核酸片段进行荧光定量 PCR 检测。试剂盒中使用 dUTP 和 UNG 酶，能够有效消除污染的扩增产物对检测结果的干扰。
【主要组成成分】

序号	组分	包装规格			体 积 / 人份	质控范围	生 物 学 来 源
		24 人份/盒	50 人份/盒	100 人份/盒			
1	核酸抽提液	1.4mL×1	1.4 mL×2	1.4mL×4	50μL		
2	巨细胞病毒核酸荧光 PCR 检测混合液	936μL×1	972μL×2	1400μL×3	36μL		
3	酶（Taq+UNG）	10.4μL×1	20.8μL×1	58μL×1	0.4μL		
4	巨细胞病毒 DNA 阴性血清对照品	50μL×1	200μL×1	1000μL×1		阴性	人
5	巨细胞病毒 DNA 临界阳性对照品	50μL×1	200μL×1	1000μL×1		5 × 10 ³ ~ 5 × 10 ⁴ copies /mL	人
6	巨细胞病毒 DNA 标准品 I	20μL×1	20μL×1	1000μL×1		5 × 10 ⁷ copies /mL	
7	巨细胞病毒 DNA 标准品 II	20μL×1	20μL×1	1000μL×1		5 × 10 ⁶ copies /mL	
8	巨细胞病毒 DNA 标准品 III	20μL×1	20μL×1	1000μL×1		5 × 10 ⁵ copies /mL	
9	巨细胞病毒 DNA 标准品 IV	20μL×1	20μL×1	1000μL×1		5 × 10 ⁴ copies /mL	

说明：不同批号的组分不可以互换使用。
【储存条件和有效期】 试剂盒应在 4℃及以下温度避光保存，有效期 12 个月。
采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封进行运输；试剂盒反复冻融不宜超过 3 次，标准品和对照品开瓶后 3 天内使用。生产日期及失效日期见标签。
【适用仪器】 本试剂盒适用于 ABI Prism® 7000 型荧光定量 PCR 仪、SLAN 荧光定量 PCR 检测系统。
【标本要求】
1.尿液 留取中段晨尿约 20mL 密封送检。**2.血清或血浆** 用一次性的针筒抽取病人静脉血 2mL，置于灭菌的一次性非抗凝试管中，取分离出的血清 0.2mL 送检；或用一次性的针筒抽取患者静脉血 2mL，置于灭菌的一次性抗凝（枸橼酸钠或 EDTA-K₂）试管中，取分离出的血浆 0.2mL 送检。溶血标本应重新抽取血样。若甘油三酯含量超过 6 mmol/L 或肉眼可见血浆/血清呈白色混浊状的标本，应 4℃ 13000rpm 离心 15min，吸取下层清亮血清或血浆送检。血清、血浆标本在 2℃~8℃可放置 72 小时，-70℃可长期保存，标本不宜反复冻融。
【检验方法】
1. 标本、对照品的处理
1.1 使用试剂盒自带提取试剂
尿液：吸取 1mL 尿液至 1.5mL 离心管中，12000rpm 离心 10 分钟，弃上清液，沉淀加无菌生理盐水 1mL 打匀，15000rpm 离心 5 分钟，弃上清液。沉淀直接加 50μL 核酸抽提液充分混匀，99℃干浴或水浴 10 分钟，然后 13000rpm 离心 10 分钟，取上清备用。
血清或血浆：50μL(冻存血清或血浆使用前在室温融解，振荡混匀 10 秒钟)，加入 50μL 核酸抽提液，振荡 10 秒钟，99℃干浴或水浴 10 分钟，13000rpm 离心 10 分钟，保留上清备用。
阴性血清对照品及临界阳性对照品：50μL (冻存对照品使用前在室温融解，振荡混匀 10 秒钟)，加入 50μL 核酸抽提液，振荡 10 秒钟，99℃干浴或水浴 10 分钟，13000rpm 离心 10 分钟，保留上清备用。
1.2 使用商业化提取试剂盒
取标本、阴性血清对照品及临界阳性对照品按照提取试剂盒的操作说明书进行提取操作。推荐使用以下已经验证的商业化提取试剂盒进行提取：

提取试剂盒	生产厂商
核酸提取试剂盒（型号：MPN05）	上海之江

2. 试剂配制 取 n×36μL 巨细胞病毒核酸荧光 PCR 检测混合液与 n×0.4μL 酶（Taq+UNG）（n 为反应管数），振荡混匀数秒，3000rpm 离心数秒。
3. 加样 取上述混合液 36μL 置于薄壁 PCR 反应管或 PCR 反应板中，然后将试剂盒内巨细胞病毒 DNA 阴性血清对照品、尿液(或血清)标本、巨细胞病毒 DNA 临界阳性对照品处理上清液及巨细胞病毒 DNA 标准品（I、II、III、IV）各 4μL 分别加入薄壁 PCR 反应管或 PCR 反应板中，盖好薄壁 PCR 反应管盖或 PCR 反应板膜，立即进行 PCR 扩增反应。
4. PCR 扩增 反应管置于定量荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：
37℃×2min；94℃×2min；循环一次，再按 93℃×15sec→60℃×1min，循环 40 次；单点荧光检测在 60℃，反应体系为 40μL。
荧光通道检测选择：CMV DNA 定量检测选用 FAM 通道。
5. 基线和阈值设定 基线调整取 6-15 个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性血清对照品的最高点。
6. 校准程序 CMV DNA 标准品加样在检验方法 3 中已经说明；实验结束后将 CMV DNA 定量标准品浓度输入仪器软件中，点击 Analyze（ABI Prism® 7000）或数据分析（SLAN 荧光定量 PCR 检测系统）选项，仪器自动生成标准曲线。
7. 质量控制 CMV DNA 阴性血清对照品检测结果应为 UNDET（ABI Prism® 7000）或<250（SLAN 荧光定量 PCR 检测系统）；临界阳性对照品 CMV DNA 检测结果应在 5×10³ copies/mL~5×10⁴ copies/mL 范围内，标准曲线相关系数应≤-0.98，否则实验视为无效。标准曲线图示如图 1：

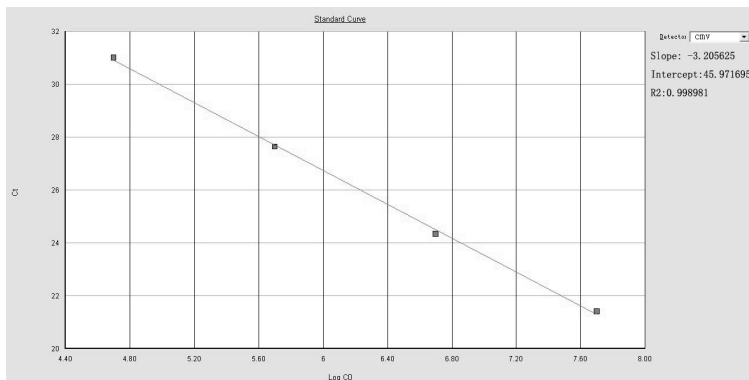


图 1

8. 试验结果的计算

仪器生成标准曲线后，自动显示待检样品定量值。尿液样品 CMV DNA 含量(copies/ml) = 定量值/20，血清血浆样品 CMV DNA 含量(copies/ml) = 定量值×2。仪器显示 UNDET (ABI Prism® 7000) 或 < 250 (SLAN 荧光定量 PCR 检测系统) 表示检测样品低于检测限，报告为阴性；待检样本检测值显示 < 10^3 copies/ml 时，检测结果报告为阳性，定量检测结果仅供参考；待检样品显示检测值在 10^3 copies/ml ~ 10^7 copies/ml 范围内，测定结果有效，可直接报告相应的定量检测结果。检测样品中定量检测值 > 10^7 copies/ml，即可直接报告为 > 10^7 copies/ml，也可按 10 倍梯度做相应稀释，使其检测结果落在 10^3 copies/ml ~ 10^7 copies/ml 范围内再重新测定，测定结果应根据稀释倍数进行校准。结果判断图释如图 2：

图中“①”为典型的阳性扩增曲线，呈 S 型。“②”为阴性检测结果。

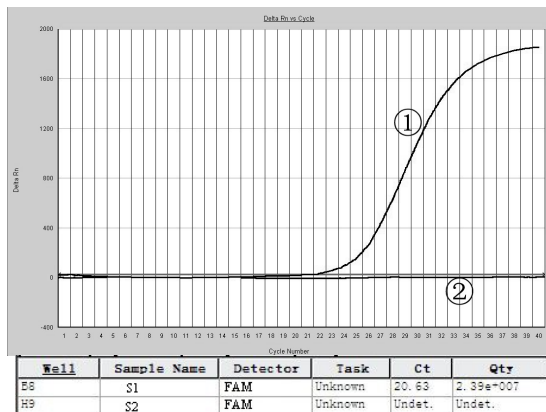


图 2

【检验结果的解释】 实验室环境污染，试剂污染，样品交叉污染会出现假阳性结果；试剂运输，保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降，会出现假阴性或定量检测不准确的结果。

CMV DNA 阴性血清对照品检测结果为阳性时结果无法判断，需要进行再次确认；或者临界阳性对照品 CMV DNA 检测结果为阴性或不在 5×10^3 copies/mL ~ 5×10^4 copies/mL 范围内，说明试剂检测效能下降，需要进行再次确认。

试验结果仅供临床参考，不作为治疗或其他临床管理的唯一依据。

【检验方法的局限性】 当患者血清中存在 CMV DNA，但其含量低于最低检测限 10^3 copies/mL 时，本试剂盒可能无法检测到，表现为假阴性的结果。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒的最低检测限： 1×10^3 copies/mL。
2. 本试剂盒的线性检测范围： 10^3 copies/mL ~ 10^7 copies/mL。
3. 本试剂盒与甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、B19 病毒、单纯疱疹病毒 I 型，EB 病毒不会发生交叉反应。
4. 阳性参考品符合率：企业阳性参考品检测结果不得出现假阴性，符合率 5/5。
5. 阴性参考品符合率：企业阴性参考品检测结果不得出现假阳性，符合率 5/5。

【注意事项】 本产品只适用于体外诊断，开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

1. 整个检测过程应严格分在三区进行：PCR 反应体系的配制区；标本处理、加样区；PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台，并进行消毒。
2. 使用不含荧光物质的一次性手套(经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
3. 试剂准备和标本处理应使用超净工作台(负压式)或防污染罩，以防止对环境污染。
4. 每次实验应设置阴、阳性对照和定量标准品。定量标准品无需核酸抽提，可直接加入 PCR 反应体系。
5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。
6. 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10%次氯酸或 75%酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
7. 实验中接触过标本和对照品的废弃物品(如吸头)、扩增完毕的离心管、标本等应进行无害化处理后方可丢弃。
8. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
9. PCR 反应混合液应避光保存。
10. 反应管中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧。
11. 不同批号的试剂请勿混用，请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

- [1] Kanoy Y, Shiohara T. Current understanding of cytomegalovirus infection in immunocompetent individuals. J Clin Microbiol, 2000, 38: 196-204
- [2] R Cunningham, A Harris, A Frankton, W Irving. Detection of cytomegalovirus using PCR in serum from renal transplant recipients. Journal of Clinical Pathology, 1995, 48: 575-577
- [3] 陈俊青, 刘霆. 巨细胞病毒感染检测方法的现状和进展, 中国输血杂志, 2005, 10(18): 428-431

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海之江生物科技股份有限公司
住所：上海市张江高科技产业东区瑞庆路528号20幢乙号1层、21幢甲号1层
联系方式：021-34680028 E-mail: river@liferiver.com.cn
售后服务单位名称：上海之江生物科技股份有限公司
联系方式：021-34680028 E-mail: service@liferiver.com.cn
生产地址1：上海市张江高科技产业东区瑞庆路528号20幢乙号1层、21幢甲号1层
生产地址2：上海市闵行区新骏环路588号26幢
医疗器械生产企业许可证编号：沪食药监械生产许20081591号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】 国械注准 20183401700

【说明书批准及修改日期】 2018-5-18