

【产品名称】

通用名称：人巨细胞病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】大包装，20 人份/盒；大包装，48 人份/盒；单管单人份，20 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定量测定尿液、血清样本中人巨细胞病毒核酸。

人巨细胞病毒（Human Cytomegalovirus, HCMV）属疱疹病毒 β 亚科，为线状双链 DNA 病毒，在世界范围内普遍存在。中国是 HCMV 感染高发区，HCMV 感染通常呈隐性感染，多数感染者无临床症状，但在一定条件下侵袭多个器官和系统可能导致严重疾病。在免疫正常的个体，HCMV 感染大多表现为无症状或亚临床型感染，但在一些免疫低下或免疫抑制人群如胎儿、婴儿、免疫功能不全或缺陷个体则可引起严重疾病。婴幼儿 HCMV 感染最常累及肝脏，引起巨细胞病毒肝炎，也常累及肺脏，引起巨细胞病毒肺炎。另外还可累及血液、消化道等多个脏器，临床症状多样且轻重不一。人群感染率高且流行广泛，孕妇、婴儿及脏器移植术后更容易发生。

采用实时荧光 PCR 方法直接从尿液、血清中检测 HCMV DNA 是既迅速又敏感准确的方法，检测结果仅供临床参考，但不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以 HCMV 基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行 PCR 扩增，用于样本中 HCMV DNA 的定量检测。另外，本试剂盒还含有针对木瓜蛋白酶 omega 基因设计的特异性引物及荧光探针，作为内标对核酸提取过程及 PCR 扩增过程进行监控，可减少假阴性结果的出现。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (大包装, 20 人份/盒)	HCMV PCR 反应液 A	540μL/管	1	特异性引物探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	HCMV PCR 反应液 B	60μL/管	1	热启动 Taq 酶、UDG 酶、dNTPs
	HCMV 内标溶液	120μL/管	1	HCMV 内标菌液
PCR 检测试剂 (大包装, 48 人份/盒)	HCMV PCR 反应液 A	1296μL/管	1	特异性引物探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	HCMV PCR 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、UDG 酶、dNTPs
	HCMV 内标溶液	240μL/管	1	HCMV 内标菌液
PCR 检测试剂 (单管单人份, 20 人份/盒)	HCMV PCR 反应管 (未贴标签管)	1 人份/管	20	特异性引物探针、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、 热启动 Taq 酶、UDG 酶、dNTPs
	HCMV 内标溶液	120μL/管	1	HCMV 内标菌液
质控品、定量参考品 (适用于大包装、 单管单人份)	阴性质控品	400μL/管	1	生理盐水
	HCMV 阳性质控品	400μL/管	1	灭活的 HCMV 病毒培养液
	HCMV 阳性定量参考品 1 (2.0×10^7 IU/mL)	100μL/管	1	HCMV 质粒
	HCMV 阳性定量参考品 2 (2.0×10^6 IU/mL)	100μL/管	1	HCMV 质粒
	HCMV 阳性定量参考品 3 (2.0×10^5 IU/mL)	100μL/管	1	HCMV 质粒
	HCMV 阳性定量参考品 4 (2.0×10^4 IU/mL)	100μL/管	1	HCMV 质粒

注：不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用；

自备的试剂：核酸提取或纯化试剂（本公司备案的 粤穗械备 20150301 号或粤穗械备 20150348 号或粤穗械备 20170583 号）。

阴阳性质控品说明：HCMV 阳性质控品为灭活的 HCMV 病毒培养液，阴性质控品为生理盐水，使用时需要参与提取，均不具有生物传染性，但操作时应视为潜在的传染物质，操作和处理均需符合相关法规要求。

【储存条件及有效期】

试剂盒保存于-20±5℃，有效期 9 个月；

反复冻融次数不超过 6 次；试剂开瓶次数不超过 6 次；试剂在 4℃ 条件下保存不超过 12 天；试剂在 37℃ 条件下保存不超过 4 天；运输温度保持在-20±5℃，运输时间不应超过 3 天。

试剂盒生产日期及有效期见产品标签。

【适用仪器】

实时荧光定量 PCR 仪 Real-Time PCR Instrument (7500)，实时荧光定量 PCR 仪 LightCycler 480 (LightCycler 480 II)，实时荧光定量 PCR 仪 (DA7600)，实时荧光定量 PCR 仪 (AGS4800)。

【样本要求】

1. 适用样本类型：尿液、血清。

2. 样本采集：

2.1 尿液：取尿液的中段尿 1mL 于 1.5mL 的无菌离心管中，离心取沉淀即为标本。最好取晨尿。

2.2 血清：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 毫升，注入无菌的干燥玻璃管，室温（22~25℃）放置 30~60 min，血标本可自发完全凝集析出血清，或直接使用水平离心机，1500g 离心 5min；吸取上层血清（注意勿带入红细胞），转移至 1.5mL 灭菌离心管。

3. 样本保存和运送：所采集的标本可立即用于测试，可以暂时保存于 4℃待测，至少可以保存 7 天，也可以保存于-20℃待测，保存期为 6 个月，或保存于-70℃，保存期至少为 1 年，标本应避免反复冻融。提取后的样本核酸溶液，建议立即使用，如需保存，置于-20±5℃，可保存 3 个月。标本运送采用 0℃冰壶或加冰并以泡沫箱密封，长途运输建议采用干冰以保持低温。

【检验方法】

1. 样本处理和核酸提取（样本处理区）

采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20150301 号或粤穗械备 20150348 号或粤穗械备 20170583 号）。本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，若提取试剂盒中无说明内标的使用方法，则可按照样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例在样本中加入内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的阴性质控品和 HCMV 阳性质控品均需要提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。HCMV 阳性定量参考品不参与提取，用于对样本核酸的定量。

2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

2.1 大包装规格试剂使用：

从试剂盒中取出 HCMV PCR 反应液 A、HCMV PCR 反应液 B，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+HCMV 阳性质控品+HCMV 阳性定量参考品）PCR 反应管。

HCMV 单人份扩增体系配制如下表：

HCMV PCR 反应液 A	HCMV PCR 反应液 B	扩增体系
27μL	3μL	30μL

将各组充分混合后进行短时离心，以使管壁上的液体全部离心至管底，之后将 30μl 扩增体系分装到 PCR 管中。

2.2 单管单人份规格试剂使用：直接使用 HCMV PCR 反应管。

3. 加样（样本制备区）

往上述对应的 HCMV 反应管中分别加入提取后的待测样本核酸、阴性质控品核酸、HCMV 阳性质控品核酸以及 HCMV 阳性定量参考品各 20μL，盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4. PCR 扩增（扩增检测区）

4.1 将反应管放入仪器样品槽内。

4.2 实时荧光定量 PCR 仪 Real-Time PCR Instrument（7500）仪器设置

4.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknow），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter 1: FAM, Quencher: NONE, Reporter 2: VIC, Quencher 2: NONE, Passive Reference: NONE。

4.2.2 打开instrument窗口，设置循环条件如下：

Stage	Reps	Target（℃）	Running Time	Data Collection
1	1	50	00: 2: 00	
2	1	95	00: 15: 00	
3	45	94	00: 00: 15	
		55	00: 00: 45	√

设置完成后，保存文件，运行程序。

4.3 实时荧光定量PCR仪LightCycler 480（LightCycler 480 II）仪器设置

4.3.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为FAM，VIC。

4.3.2 设置循环条件：

Program Name	Cycles	Target(℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 2: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	45	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

4.3.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称、类型，在“Standard Concentration”框中输入标准品浓度，设置完成后，保存文件，运行程序。

4.4 实时荧光定量 PCR 仪（DA7600）仪器设置

4.4.1 打开软件后，在设置程序参数界面中，设置扩增程序和温度设置，条件如下：

编号	程序名	循环	目标温度	恒温时间	读取荧光
1	1	1	50	00: 2: 00	
2	2	1	95	00: 15: 00	
3	3	45	94	00: 00: 15	
			55	00: 00: 45	√
4	4	1	40	00: 00: 20	

4.4.2 点击样本参数界面，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（UNK），并在“样本名称”一栏中设置样本名称；探针染料类型选择：FAM 和 HEX。

- 4.4.3 设置完成后，保存文件，运行程序。
- 4.5 实时荧光定量 PCR 仪（AGS4800）仪器设置
 - 4.5.1 先开电脑，再开定量 PCR 仪主机电源，最后启动 AGS4800 软件，选择对应的层（上、中、下）。
 - 4.5.2 点击 新建，在试验名称中编辑实验名、文件路径，保存后点击确定打开一个空白文件。
 - 4.5.3 程序参数：在程序参数页面。扩增参数如下：

程序段	循环数	目标温度（℃）	恒温时间	读取荧光
1	1	50	00: 2: 00	
2	1	95	00: 15: 00	
3	45	94	00: 00: 15	
		55	00: 00: 45	√
4	1	40	00: 00: 20	

- 4.5.4 样本参数：点击样本参数页面，在上门菜单快捷键中选择当前程序染料设置（通道 1 FAM，通道 2 VIC，其余为空）下面 48 孔表中选定样品孔，右边染料类型图片边沟上 FAM 和 VIC，并在下面按钮中选择对应的样本类型：阴性质控品、未知样品等。
- 4.5.5 启动扩增：确认 48 孔板在主机内放置妥当后，点击开始按钮开始 PCR 循环。
- 4.5.6 监控进程：切换程序运行页面，可以实时显示 PCR 曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果标记物选 FAM 或 VIC，只显示对应探针的变化情况。
- 4.5.7 保存结果：程序结束后，自动保存到文件路径。

5. 结果分析(请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例)

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，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果，在此基础上，微调阈值线位置使所得标准曲线的 R² 值最大即可在“Report”窗口读取检测结果。

6. 质量控制

- 6.1 阴性质控品：FAM 检测通道无扩增曲线或 Ct 值≥44；VIC 检测通道有扩增曲线。
 - 6.2 HCMV 阳性质控品：FAM 检测通道有扩增曲线，且定值范围在 4.0×10⁴~5.0×10⁶IU/mL 内；
 - 6.3 HCMV 阳性定量参考品：FAM 检测通道有扩增曲线，Ct 值<40，且相关系数|r|≥0.9800；
- 以上要求需在同一实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【阳性判断值】 本试剂盒的阳性判断值为 44。

【检验结果的解释】

- 1. 每次实验均需检测阴性质控品，HCMV 阳性质控品及 HCMV 阳性定量参考品，结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。
- 2. 阴性结果判定标准：FAM 检测通道无扩增曲线或 FAM 检测通道有扩增曲线且 Ct 值≥44，VIC 检测通道有扩增曲线。
- 3. 阳性结果判定标准：FAM 检测通道有扩增曲线，且 Ct 值<44，VIC 检测通道有或无扩增曲线。
- 4. 报告建议采用以下格式：
 - 阴性结果报告格式为：样本未检测到人巨细胞病毒 DNA；
 - 阳性结果报告格式为：
- 4.1 当样本的试验结果浓度 C<1.00E+002，VIC 检测通道有或无扩增曲线，报告格式为：样本的人巨细胞病毒 DNA 浓度低于试剂盒的灵敏度，不能稳定检出，检测结果仅供参考；
- 4.2 当样本的试验结果浓度在 1.00E+002≤C<2.00E+002，VIC 检测通道有或无扩增曲线，报告格式为：样本的人巨细胞病毒 DNA 浓度高于试剂盒灵敏度，低于试剂盒的线性范围，能稳定检出，但定值结果不稳定，检测浓度仅供参考；
- 4.3 当样本试验结果浓度在 2.00E+002≤C≤2.00E+008 时，报告格式为：样本检测到人巨细胞病毒 DNA，其浓度为 C IU/mL；
- 4.4 当样本的试验结果浓度 C>2.00E+008 时，报告格式为：样本检测到人巨细胞病毒 DNA，浓度大于 2×10⁸IU/mL；如经稀释后检测，则报告格式为：样本检测到人巨细胞病毒 DNA 浓度为（稀释后的浓度×稀释倍数）IU/mL。

【检测方法的局限性】

- 1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关；
- 2. 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；
- 3. 病毒在流行过程中的基因突变则也可能导致假阴性结果；
- 4. 由于不同提取方法的原理不同，采用不同核酸提取试剂进行样本处理时的核酸提取效率存在一定差异，请使用本产品说明书中检验方法所选用的核酸提取试剂；
- 5. 阴性的检测结果仅说明样本中病毒滴度低于本试剂盒的灵敏度 1.0×10²IU/mL(相当于 3.75×10²copies/mL)，但不能排除人巨细胞病毒感染的可能性。
- 6. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【产品性能指标】

试剂盒分析性能评估结果显示，本试剂盒：

- 1. 灵敏度：1.0×10²IU/mL(相当于 3.75×10²copies/mL)。
- 2. 线性范围：2.0×10²IU/mL~2.0×10⁸IU/mL。
- 3. 准确度：10 份阳性参考品检测结果均为阳性，符合率为 100%；10 份阴性参考品检测结果均为阴性，符合率为 100%。将人巨细胞病毒国际标准品（NIBSC code:09/162）在本试剂盒线性范围内进行梯度稀释后检测，检测浓度对数值与理论浓度对数值的绝对偏差不超过 0.5，且相关系数|r|≥0.9800。

4. 交叉反应：与感染部位相同或感染症状相似的其他病原体如：人类乳头瘤病毒 6 型 (HPV 6) (1.0×10^5 copies/mL)、人类乳头瘤病毒 11 型 (HPV 11) (1.0×10^5 copies/mL)、单纯疱疹病毒 I 型 (HSV I) (1.0×10^5 copies/mL)、单纯疱疹病毒 II 型 (HSV II) (1.0×10^5 copies/mL)、带状疱疹病毒 (1.0×10^5 copies/mL)、EB 病毒 (1.0×10^5 copies/mL)、风疹病毒 (1.0×10^5 copies/mL)、乙型肝炎病毒 (1.0×10^5 copies/mL)、人疱疹病毒 6 型 (1.0×10^5 copies/mL)、甲型流感病毒 (1.0×10^5 copies/mL)、金黄色葡萄球菌 (1.0×10^6 cfu/mL)、白色念珠菌 (1.0×10^6 cfu/mL)、甲型肝炎病毒 (1.0×10^5 copies/mL) 和肺炎支原体 (1.0×10^5 copies/mL) 无交叉反应。

5. 干扰实验：常见内源性干扰物质胆红素 (0.1 mg/mL)、甘油三酯 (2.26 mmol/L)、血红蛋白 (200 mg/mL)、黏蛋白 (200 mg/dL)、白细胞 (10.0×10^9 个/L)、尿素 (7.5 mmol/L) 对试剂盒检测结果无干扰；常见的外源性干扰物质如常用药物更昔洛韦 (0.3 mg/mL)、膦甲酸 (0.5 mg/mL)、缬更昔洛韦 (0.4 mg/mL)、西多福韦 (0.1 mg/mL) 等对本试剂盒检测结果无干扰。

6. 精密度：阴性样本的检测结果显示均为巨细胞病毒阴性；检测 1.0×10^5 IU/mL、 1.0×10^3 IU/mL 浓度样本，检验结果显示试剂盒批内、批间、日内、日间及操作者间的精密度检测定量值的对数值变异系数均不大于 5.0%。检测精密度参考品 R1、R2，重复检测 10 次，检测结果均为巨细胞病毒阳性，且 R1 的 FAM 通道的定量值的对数值变异系数均不大于 5.0%，R2 的 FAM 通道的定量值的对数值变异系数均不大于 10.0%。

7. 临床试验结果：本次临床试验中，纳入统计的样本共 1214 例，与对照试剂相比，待考核试剂盒的检测阳性符合率为 96.89%，阴性符合率为 94.30%，总符合率为 95.47%；kappa 检验一致性分析表明，待考核试剂与对照试剂检测结果一致性较好 (kappa=0.909, $P < 0.001$)，具有统计学意义。定量值线性范围内，回归方程式 $Y = 1.021X + 1.571$ ， $|R| = 0.936$ ， $P < 0.0001$ ， $n = 253$ ，分析表明，待考核试剂与对照试剂检测定量结果一致性较好，且具有统计学意义。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书；
2. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：包括卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》；
3. 产物处理：PCR 结束之后，产物容易引起污染，应由当天不再参与实验的人员将所有反应管放入生物安全垃圾处理袋或其他容器中确认完全封闭后方可丢弃；
4. 实验过程中穿工作服，佩戴一次性手套和口罩。在洁净消毒、紫外光杀菌的化学通风橱或生物安全柜完成操作，避免有害物质进入呼吸道；
5. 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头；
6. PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融；
7. 如果在样本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性；
8. 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（试剂准备区、样本制备区、扩增检测区），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；
9. 实验完毕用 10% 次氯酸或 75% 酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20-30 分钟；
10. 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于 -20°C 待用；
11. 须对每次实验进行质量控制。

【参考文献】

1. Suresh B. Boppana, M.D., Shannon A. Ross, M.D. Dried blood spot real-time polymerase chain reaction assays to screen newborns for congenital cytomegalovirus infection. JAMA, 2010, 303(14): 1375 - 1382.
2. Shu Zhang, Yi-Hua Zhou, Lei Li, et al. Monitoring human cytomegalovirus infection with nested PCR: comparison of positive rates in plasma and leukocytes and with quantitative PCR. J Virology Journal, 2010, 7:73.
3. S.C.B. Costa, S.R.P. Miranda, et al. Detection of cytomegalovirus infections by PCR in renal transplant patients. J Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 1999, 32: 953-959.

【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；广州市高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 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】