

【产品名称】

通用名称：人巨细胞病毒(HCMV)核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒对人尿液中的人巨细胞病毒核酸(HCMV DNA)进行定量检测。

人巨细胞病毒(HCMV)感染可分为先天感染和后天感染，先天性感染症状有黄疸、肝脾肿大、淤斑、中枢神经系统异常等现象，而后天感染，主要通过性接触以及体液传播，成年人血清抗体阳性率可达 80%以上，HCMV 初次感染后绝大多数为无症状的隐形感染，可长期潜伏在人体内，甚至终身带毒。HCMV 病毒的实验室检测有：1)HCMV 病毒分离检测；2)HCMV 特异性标志物检测；3)血清学诊断检测等。本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 方法。

【检验原理】

本试剂盒选用人巨细胞病毒保守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，实现在全封闭反应体系中对人巨细胞病毒核酸的自动化检测。

本试剂盒设计一段人工合成的非竞争性的序列为内标模板，与人巨细胞病毒的目标基因无干扰，再将这段序列输入 NCBI 网站进行 BLAST 比对分析，证实这段序列在 NCBI 的核酸库中是无法找到的，不会相互干扰，根据该内标模板设计引物探针，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】

组成名称	主要成分	规格与装量
核酸提取液	含 0.5%Triton-100、5%Chelex-100、内标模板	1.8mL×1
人巨细胞病毒反应混合液	含 Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dNTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq 酶	含 Taq DNA 酶及抗体	28μL×1
人巨细胞病毒强阳性对照	含 HCMV 基因组 DNA(重组克隆) 浓度为 10 ⁶ copies/mL	100μL×1
人巨细胞病毒临界阳性对照	含 HCMV 基因组 DNA(重组克隆) 浓度为 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 HCMV 基因组 DNA(重组克隆) 浓度范围：1.0×10 ⁴ copies/mL~5.0×10 ⁴ copies/mL	20μL×1
定量标准品 2#	含 HCMV 基因组 DNA(重组克隆) 浓度范围：1.0×10 ⁵ copies/mL~5.0×10 ⁵ copies/mL	20μL×1
定量标准品 3#	含 HCMV 基因组 DNA(重组克隆) 浓度范围：1.0×10 ⁶ copies/mL~5.0×10 ⁶ copies/mL	20μL×1
定量标准品 4#	含 HCMV 基因组 DNA(重组克隆) 浓度范围：1.0×10 ⁷ copies/mL~5.0×10 ⁷ copies/mL	20μL×1

注：1. 定量标准品具体标值参见试剂盒内指示，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 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：尿液
2. 采集：取晨尿 10mL 于无菌的干燥玻璃管中，密闭送检。
3. 存放：2~8℃保存，不超过 24 小时；-20℃以下保存，不超过 3 个月；-70℃以下长期保存，但应避免反复冻融。
4. 运输：采用泡沫箱加冰袋密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

取待测标本 1mL 于 1.5mL 离心管中(冻存标本使用前在室温融解并充分混匀)，充分震荡摇匀，12000 rpm 离心 5 分钟。弃上清取沉淀加入 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 10sec，100℃水浴或干浴 10min，12000rpm 离心 10min，上清供 PCR 扩增用(如样本裂解产物当天不使用，请于-20℃保存)。阴性对照、阳性对照直接取出 50μL，加入 50μL 核酸提取液，混匀后 100℃水浴或干浴 10min。12000rpm 离心 10min，备用。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从检测试剂盒中取出人巨细胞病毒反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10sec。计算所需反应试剂测试量 n[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	人巨细胞病毒反应混合液	Taq 酶	总体积
用量	35.2μL	0.8μL	36μL

按 n 人份计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中，混匀，按 36μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

按一定顺序向反应液中分别加入 4μL 的阴性对照、人巨细胞病毒临界阳性对照、人巨细胞病毒强阳性对照、定量标准品(无需抽提)和样品的上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 扩增区。

4. PCR 扩增及荧光检测【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 值无数据且内标 Ct 值 <40。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。

6. 标准曲线制作与定量结果的读取

根据试剂盒上标示浓度对定量标准品（1#~4#）进行赋值，以赋值后的 1#~4# 定量标准品作标准曲线，并且制作的标准曲线线性相关系数 $|r| \geq 0.98$ 时，制作的标准曲线有效。

制作有效标准曲线后，检测样本根据标准曲线被赋予一个具体数值，该数值为检测样本的定量结果。

【阳性判断值】

人巨细胞病毒阳性判断：FAM 通道 Ct 值 ≤ 37 时，则判断该样本为人巨细胞病毒核酸阳性。

【检验结果的解释】

1. 检测样本 FAM 通道的 Ct 值 ≤ 37 均判定为阳性，其中：

- 检测样本 FAM 通道的测定值在 1.0×10^4 copies/mL $\leq$ HCMV DNA $\leq 1.0 \times 10^8$ copies/mL 范围内，可直接报告定量结果。
- 检测样本 FAM 通道的 HCMV DNA $> 1.0 \times 10^8$ copies/mL 时，应做适当稀释，使其落入有效范围内。
- 检测样本 FAM 通道的测定值在 HCMV DNA $< 1.0 \times 10^4$ copies/mL 时，报告定性结果。

2. 检测样本 FAM 通道的 Ct 值 > 37 ，且内标 VIC 通道的 Ct 值小于 40，那么报告为阴性结果。

3. 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】

- 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。
- 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。
- 本试剂盒适用于使用 ABI7500、天隆 TL988-IV 两种荧光定量检测系统对人尿液中 HCMV DNA 的定量检测，其他仪器尚无可靠实验数据，请谨慎使用。

【产品性能指标】

- 外观：试剂盒包装完好，盛装各试剂的冻存管及离心管无破损，标签完好。
- 分析特异性：8 份阴性参考品，检验结果均应为阴性，符合率(-/-)为 8/8。
- 阳性符合率：8 份阳性参考品，检验结果均应为阳性，符合率(+/-)为 8/8。
- 线性：
 - 样本线性： 1.0×10^4 copies/mL ~ 1×10^8 copies/mL 范围内线性参考品相关系数 $|r| \geq 0.98$ 。
 - 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 $|r| \geq 0.98$ 。
- 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。
- 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 $\geq 22/25$ 。
- 精密度：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, %) $\leq 5\%$ 。
- 交叉反应：本试剂盒与乙型肝炎病毒(HBV)、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒 16 型(HPV-16)、解脲支原体(UU)、沙眼衣原体(CT)、单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)、单纯疱疹病毒 II 型(HSV-II)、淋球菌(NG)均无交叉反应。

【注意事项】

- 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。
- 本试剂盒仅用于体外检测，不可用于血源筛查。
- 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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。
- 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，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
- 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。
- PCR 反应混合液应避光低温保存。
- 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】

- Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
- Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026-1030.
- Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.
- 中华医学会儿科学分会感染消化组<中华儿科杂志>编委会. 巨细胞病毒感染诊断方案[J].中华儿科杂志,1999,(07):441.doi:10.3760/j.issn:0578-1310.1999.07.015.
- 吴旗,虞涛. PCR 法与荧光定量 PCR 法在人巨细胞病毒检测中的作用比较[J].中华中医学杂志,2006,(01):11-16.
- Khare M,Sharland M,Manyonda I. PCR to detect primary CMV infection in seronegative pregnant women[J].Journal of Virological Methods, 2004,(1):31-35.doi:10.1016/j.jviromet.2004.02.013.

【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 20153402138

【说明书核准日期及修改日期】2020.09.14