

	技术文件： 腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）产品说明书	文件编号	版本号	生效日期
		INS-HS01	B3	2020.07.15
		编制/日期		
		审核/日期		
		批准/日期		

腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

说明书



【产品名称】

通用名称：腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测人口咽拭子样本中腺病毒（ADV）核酸。

腺病毒是引起呼吸道感染的重要病原体，某些型别甚至可引起急性呼吸道感染的暴发流行，特别是在婴幼儿中可引起严重的支气管炎甚至是致命的肺炎，还可以引起眼结膜炎、脑炎、膀胱炎、腹泻等。可感染各年龄人群，易感人群为5岁以下的婴幼儿。本试剂盒的检测对象为具有以上症状的患者。

人类腺病毒有51个血清型，A-F 6个亚群，基因组为线性双链DNA分子。与呼吸道感染有关的是B、C和E组。与胃肠道感染有关的是A、F组，与眼部感染有关的是D和E组，与肾脏及尿道感染有关的是D和E组。腺病毒耐酸，故能通过胃肠道而继续保持活性。

本试剂盒适用于腺病毒感染的辅助诊断，结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

实验操作人员应接受过基因扩增或分子生物学方法检测的专业培训，具备相关的实验操作资格，实验室应具备合理的生物安全防护设施及防护程序。

【检验原理】

本试剂盒利用核酸提取纯化和实时荧光 PCR 检测技术。

核酸提取试剂，即采用经典的细胞裂解、核酸沉淀、洗涤晾干复溶的方法。采用强变性剂（异硫氰酸胍和 N—十二烷基肌氨酸钠等）裂解细胞和病毒释放出游离的核酸，再利用异丙醇沉淀核酸，75%乙醇洗涤，得到核酸分子。

查找腺病毒相关文献，在 NCBI 核酸数据库中检索的腺病毒基因组序列，获得的检索结果，下载整理后，用 BioEdit 软件进行多序列比对，分析腺病毒基因组保守序列。在腺病毒基因组 E1A 基因区（与腺病毒复制相关）核酸序列保守度较高。因此选择在该区域中设计引物探针，设计三组引物探针；设计的引物探针序列再通过 BLAST 对比数据库，确认其特异性并对设计的引物探针性能进行验证。

本试剂盒以腺病毒基因中的高度保守序列 E1A 为靶区域，设计特异性引物和 TaqMan 荧光探针，腺病毒荧光素为 FAM，扩增片段长度 72bp。通过进行 PCR 扩增，在扩增管中实现对口咽拭子样本中腺病毒的快速检测，并通过外源性内标和外标质控品（强阳性对照、临界阳性对照和阴性对照），对检测过程进行全程质量控制。本试剂盒设计的外源性内标为 DNA 噬菌体 M13，设计 M13 特异性的引物和探针，内标的荧光素为 ROX，扩增长度为 74bp，监测整个实验过程。

本试剂盒组成包括核酸提取试剂、核酸扩增试剂和质控品三部分。其中核酸提取试剂组包括核酸提取液 A、核酸提取液 B、核酸提取液 C 和样本稀释液；核酸扩增试剂包括腺病毒/内标扩增反应液、Taq DNA 聚合酶；质控品包括腺病毒强阳性对照、腺病毒临界阳性对照、阴性对照和 DNA 内标。

	技术文件：		文件编号	版本号	生效日期
	腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）产品说明书		INS-HS01	B3	2020.07.15

【主要组成成分】

类别	组成	主要组份	规格	数量
核 酸 提 取 试 剂	1、核酸提取液 A	异硫氰酸胍	10mL/瓶	1 瓶
	2、核酸提取液 B	异丙醇	10mL/瓶	1 瓶
	3、核酸提取液 C	乙醇、超纯水	10mL/瓶	1 瓶
	4、样本稀释液	超纯水	1.5mL/支	2 支
核 酸 扩 增 试 剂	5、腺病毒/内标扩增反应液	腺病毒引物、腺病毒探针、内标引物、内标探针、脱氧三磷酸核苷、镁离子、缓冲液和超纯水	1.0mL/支	1 支
	6、Taq DNA 聚合酶	Taq DNA 聚合酶	15μL/支	1 支
质 控 品	7、腺病毒强阳性对照	灭活腺病毒病毒（浓度 $10^{4.35}$ TCID ₅₀ /ml）	冻干品	2 支
	8、腺病毒临界阳性对照	灭活腺病毒病毒（浓度 $10^{1.35}$ TCID ₅₀ /ml）	冻干品	2 支
	9、阴性对照	超纯水	100μL/支	1 支
	10、DNA 内标	灭活噬菌体 M13、牛血清白蛋白，吐温 20	冻干品	2 支

试剂盒不提供但需准备的仪器和耗材：

- 0.6mL 离心管（推荐 AXYGEN）
- 八排管或 96 孔板（推荐 AXYGEN）
- 移液器（10μL、100μL、200μL、1000μL）
- Tip 头（10μL、100μL、200μL、1000μL）
- 离心机（手掌型离心机；高速离心机，转速 ≥ 13000 rpm）等

备注：

- 不同批次核酸扩增试剂和质控品不得混用；
- 质控品说明：阴性对照为超纯水；腺病毒强阳性对照和腺病毒临界阳性对照为含腺病毒的冻干品；内标为含 M13 噬菌体的冻干品，使用前用样本稀释液复溶。以上质控品均需核酸提取过程处理。

【储存条件及有效期】

试剂盒未开封情况下于-25~-15℃避光保存，有效期 12 个月。

试剂盒开封后有效期为 6 个月，且 6 个月内开瓶次数不超过 3 次，开封储存温度-25~-15℃。

尽量避免反复冻融，且冻融次数不超过 5 次。

试剂盒采用泡沫盒加冰袋或干冰封装运输（冰袋的数量以试剂盒上下左右前后完全覆盖试剂盒为标准），运输温度控制在-80~30℃。并在该条件下密封暂存不超过 7 天。

生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

ABI 7500 Real-Time PCR System；上海宏石医疗科技有限公司全自动医用 PCR 分析系统（型号：SLAN-96P）；西安天隆科技有限公司实时荧光定量 PCR 仪（型号：TL 988）。

【样本要求】

- 样本类型：口咽拭子样本。
- 样本采集对象：有呼吸道感染症状、肺炎等患者或有密切接触史的人群。
- 样本采集器材：

拭子：应使用头部为合成纤维（如聚酯纤维）的塑料杆蓬松拭子。不推荐棉拭子和木杆拭子。

采集管：推荐使用外螺旋口、耐-70℃冻存的塑料管。

采样液：病毒采样液推荐使用生理盐水。
- 样本采集部位及方法：由检查者用压舌板辅助，将拭子越过被采样者舌根到咽后壁及扁桃体隐窝、侧壁等处，反复擦拭3~

	技术文件: 腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）产品说明书	文件编号	版本号	生效日期
		INS-HS01	B3	2020.07.15

5次，收集粘膜细胞，避免触及舌、口腔粘膜和唾液。将拭子头浸入含3mL生理盐水的螺口塑料管中，尾部弃去，旋紧管盖。

5. 样本运输：样本应立即用加冰保温盒储存并运送至实验室。

6. 样本保存：

短期：保存在 2-8℃，24 小时内检测结果稳定。

长期：保存在-70℃，3 个月内检测结果稳定。

7. 样本在运输和储存过程中要尽量避免反复冻融，反复冻融不超过 3 次，检测前需充分解冻。

【检验方法】

一、使用前准备：

1. 需准备的物品：0.6mL 离心管，移液器吸头，离心机（配 0.6mL 转子或适配器）。推荐使用进口离心管和带滤芯移液器吸头进行操作，检测过程中勿使用带荧光物质的一次性乳胶手套。
2. 分别用 200μL 样本稀释液复溶腺病毒强阳性对照、腺病毒临界阳性对照和 DNA 内标，混匀并短暂离心，备用。
3. 试剂盒中各组分（除 Taq DNA 聚合酶）充分解冻并混匀。

二、核酸提取（在样本处理区进行）：

所有步骤均可在室温下进行。如离心机有制冷功能，请将温度设定在 25℃。

1. 取 200μL 核酸提取液 A 于 n（n=样本数+3 个外标质控品）个 0.6mL 离心管中，每管加入 5μL 内标（阴性对照不用加内标！）。
2. 每管分别加入待检样本、腺病毒强阳性对照、腺病毒临界阳性对照和阴性对照各 50μL，做好标记，充分混匀并短暂离心，室温静置 3 分钟；
3. 每管加入 200μL 核酸提取液 B，充分混匀，13000rpm 离心 10 分钟，吸弃上清；
4. 每管加入 200μL 核酸提取液 C，颠倒数次混匀，13000rpm 离心 5 分钟，吸弃上清，开盖在室温或 55℃ 放置 2~5 分钟晾干；
5. 每管加入 25μL 样本稀释液，盖上管盖，用手指弹管底部或振荡器震荡，使核酸充分溶解，短暂离心使液体全部落于管底部，冰上或 2-8℃ 放置，用于 PCR 检测。

三、PCR 扩增：

PCR 扩增包括腺病毒和内标扩增反应。

1. 配液（在试剂准备区进行）：取出腺病毒/内标扩增反应液，室温融化后充分混匀，短暂离心，并按反应个数 n（n=样本数+3 个外标质控品）分别取反应液和酶按照以下配比配置反应液：

试剂	腺病毒/内标扩增反应液	Taq DNA 聚合酶
用量（n 人份）	20μL × n	0.3μL × n

计算好各试剂用量，加入适当体积于离心管中，充分混匀，短暂离心，然后按 20μL/管分装到透明 PCR 八排管或 96 孔 PCR 反应板中，转移至样本处理区；

2. 加样（在样本处理区进行）：分别加入 5μL 步骤二中处理好的样本核酸、腺病毒强阳性对照、腺病毒临界阳性对照和阴性对照，盖好管盖（透明平盖），手掌离心机离心 15s 将管壁上的液体甩到管底，如有气泡轻弹管壁消除气泡，再次离心，转移至核酸扩增区；
3. PCR 扩增（在核酸扩增区进行）：

将反应管/板置于 PCR 仪样品槽中。FAM、ROX 两种荧光同时勾选，其中 FAM 荧光指示腺病毒，ROX 荧光指示内标，荧光采集为 Stage2 Step2 (55℃ 00:35)，循环参数设定：

步骤	循环数	温度	时间
1	1	94℃	2 分钟
2	40	94℃	10 秒
		55℃	35 秒

注: 1) 如使用 ABI 7500 Real-Time PCR System, 请务必于 passive reference 和 quencher 处选择 “none”;

2) 若与本公司 RT-PCR 试剂盒同时进行, 可在步骤 1 前增加步骤 (48℃, 5 分钟, 循环数为 1), 此程序已验证。

四、结果分析

1. 反应结束后仪器自动保存数据文件, 根据相关仪器的软件进行分析。

2. 分析条件设置

2.1 ABI 7500 Real-Time PCR System: 根据分析后图像调节 Baseline 的 start 值、end 值 (可根据试验情况自行调整, 一般情况下 start 值可变范围在 1~10, end 值可变范围在 5~20)。在 Linear 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值, 或者直接拉动 threshold 线, 使得 threshold 线位于扩增曲线指数扩增期。选择 Analyze 自动分析结果。

2.2 上海宏石医疗科技有限公司全自动医用 PCR 分析系统: 根据分析后图像调节基线起点和终点 (可根据试验情况自行调整, 一般情况下基线起点可变范围在 1~10, 基线终点可变范围在 5~20); 在基本参数窗口设置阈值, 或者直接拉动阈值线, 使得阈值线位于扩增曲线的指数扩增期。选择 “分析” 自动分析结果。

2.3 西安天隆科技有限公司的实时荧光定量 PCR 仪: 根据分析后图像在结果分析窗口设置阈值, 或者直接拉动阈值线, 使得阈值线位于扩增曲线的指数扩增期。选择 “重新分析” 自动分析结果。

3. 记录样本 Ct 值。

五、质量控制

1. 阴性对照需在 FAM 和 ROX 荧光素下荧光信号均无明显增长, 且无明显 S 型扩增曲线。

2. 腺病毒强阳性对照需在 FAM 荧光素下荧光信号有明显增长, 呈典型的 S 型曲线, 且 Ct 值 ≤ 21.00; 在荧光素 ROX 下内标的荧光信号有明显的增长, 呈典型的 S 型曲线, 且 Ct 值 ≤ 35.00。

3. 腺病毒临界阳性对照需在 FAM 荧光素下荧光信号均有明显增长, 呈典型的 S 型曲线, 且 Ct 值 ≤ 30.00; 在荧光素 ROX 下内标的荧光信号有明显的增长, 呈典型的 S 型曲线, 且 Ct 值 ≤ 35.00。

4. 要求在同一实验中的同一荧光素下设置相同的阈值 (Threshold), 并同时满足以上三条质控要求; 选择 FAM 荧光素时, 临界阳性对照与强阳性对照的差值 ≥ 6.00。否则, 实验结果不成立。

【阳性判断值】

局限性: 每个实验室应考虑阳性判断值 (参考范围) 的适用性, 如有必要, 应自行确定。同时将年龄、性别和种族等其他相关差别作为参考因素。

通过分析检测限参考品结果的单侧上限 95% 置信区间和用 ROC 曲线方法回顾性分析临床试验数据, 确定本试剂盒的阳性判断值为 Ct 值等于 35.00。除 Ct 值要求外, 对于接近阳性判断值的弱阳性结果或者接近阳性判断值阴性结果建议结合扩增结果的 S 型曲线对结果进行判断。详见结果判定表格:

结果判定表格:

Ct 值		结果判定
腺病毒(FAM)	内标(ROX)	
≤ 35.00	任何	腺病毒 阳性
> 35.00	≤ 35.00	腺病毒 阴性
> 35.00	> 35.00 或 Undet	试验不成立, 需对该样本做重复试验或重新采样

备注: 内标 Ct 值的确定: 对于目的基因检测为阳性, 内标的检测结果可能为阳性, 也有可能因为高浓度的目的基因扩增导致内标检测结果为阴性。



【检验结果的解释】

综合分析仪器给出的各项数据, 设定合理的阈值 (Threshold) 和基线 (Baseline), 使仪器给出正确的结果。结果分析时请分别针对 FAM 或 ROX 荧光单独进行判断。

一、质量控制分析

每次试验均需检测阴性对照、强阳性对照和临界阳性对照, 质控品结果满足检验方法中质量控制要求时方可进行检测结果的判定。

二、结果解释:

1. 判定说明:

阴性结果判定: 待检样本无明显荧光增幅且无典型 S 型曲线, 或待检样品 FAM 荧光 (腺病毒) Ct>35.00 或 Undet、ROX 荧光 (内标) Ct≤35.00, 判定为阴性样本。

阳性结果判定: 荧光增幅明显, 且 Ct 值符合结果判定表格条件, 判定为阳性样本。

2. 结果示例:

待检样本 4 份使用本试剂盒检测。检测结果包括强阳性对照、临界阳性对照、阴性对照和待检样本 1~4, 检测结果如下:

样本	第一次检测结果		第二次检测结果		结果判定
	腺病毒 FAM	内标 ROX	腺病毒 FAM	内标 ROX	
1	24.03	26.29	无需第二次检测		腺病毒 阳性
2	Undet	28.00			腺病毒 阴性
3	21.70	Undet			腺病毒 阳性
4	Undet	Undet	Undet	29.98	腺病毒 阴性
强阳性对照	19.40	26.00	19.18	26.10	正常
临界阳性对照	28.12	27.22	27.88	28.31	
阴性对照	Undet	Undet	Undet	Undet	

3. 结果报告建议采用以下形式:

阴性结果: 样本中未检测到腺病毒核酸, 或样本中被检测物浓度低于试剂盒最低检测限。

阳性结果: 样本中检测到腺病毒核酸。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒适用于腺病毒感染的辅助诊断, 结果仅供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据, 对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。

【产品性能指标】

1. 最低检测限 (分析灵敏度): 根据产品分析性能评估结果, 与金标准方法——病毒分离培养鉴定方法比较, 本试剂盒针对 7 型腺病毒最低检测限为 0.22TCID₅₀/0.1mL, 针对 3 型腺病毒最低检测限为 0.13 TCID₅₀/0.1mL。
2. 检测 10 份企业阳性参考品, 符合率 100%; 检测 10 份企业阴性参考品, 符合率 100%。
企业的阳性参考品选用了 6 株不同浓度腺病毒临床分离株培养物 (10⁴~10⁶ TCID₅₀/mL) 和 1 株噬菌体 M13 的培养物 (浓度 10⁴ pfu/ml), 企业的阴性参考品选用了 10 种与腺病毒培养相关 (细胞培养液配制后用冻干稀释液稀释 100 倍、10⁶ 个 /mL Hep-2 细胞液) 或病毒感染部位相同或引起症状类似的浓度为 10⁵ TCID₅₀/mL 病毒培养物 (A 型流感病毒 H3N2 亚型、A 型流感病毒季节性 H1N1 亚型、A 型流感病毒 2009H1N1 亚型、肠道病毒 71 型、柯萨奇病毒 A16 型、B 型流感病毒、呼吸道合胞病毒 long 株、副流感病毒 3 型)。除细胞培养液为企业配制, 其他企业阳性参考品和阴性参考品的毒株均来源于标准株或临床分离株。
3. 本试剂盒针对腺病毒的检测能力经过了实验室验证, 能够特异性的检测腺病毒病毒的核酸, 包括 A 亚群血清型 12; B1 亚群血清型 3、7 型; B2 亚群的血清型 11、14、35 和 55; C 亚群血清型 1、2; D 亚群血清型 8、13、39; E 亚群血清型 4 型; F 亚群血清型 40、41 共 15 血清型; 与感染部位相似或者感染症状相似的 59 种相关病原体均无交叉反应, 如呼吸道合胞病毒、人副流感病毒 1/2/3 型, 甲型流感病毒 (H₃N₂ 亚型、H₁N₁ 亚型、2009H₁N₁ 亚型)、乙型流感病毒、柯萨奇病

毒 A16 型、诺如病毒(10^5 copies/mL)、单纯疱疹病毒 1、单纯疱疹病毒 2 型 (Ct 值 13.5)、水痘带状疱疹病毒 (Ct 值 18)、轮状病毒、甲型肝炎病毒 (25U/0.5mL)、巨细胞病毒、流行性腮腺炎病毒、肺炎支原体 (Ct 值 20)、B 族链球菌、肺炎克雷伯菌、流感嗜血杆菌、棒状杆菌、卡他莫拉菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、志贺菌、弧菌、厌氧菌、原虫 (棘阿米巴 DNA, 1000 pg/ μ L)、草绿色链球菌、黏液罗氏菌、大肠杆菌、肺炎链球菌、脑膜炎奈瑟菌等 (除上述已标识的浓度, 以上病毒浓度为 10^5 TCID₅₀/mL 以上, 细菌为 10^6 cfu/mL)。

4. 精密度: 对腺病毒毒株制备的高低两个浓度的精密度参考品进行检测, 批内批间不精密度均不大于 5%。
5. 常见的干扰物质, 如血液在浓度 5% 时, 不会对样本检测结果产生影响, 但采样时应避免上述物质的干扰。
6. 检测样本中含有以下浓度的药物, 不会影响到试剂盒对样本的检测能力: 225 mg/L 三氯唑核苷、0.15 mg/L 地塞米松、0.05% 羟甲唑啉、500mg/L 氟尼缩松、500 mg/L 莫匹罗星、100mg/L 苯巴比妥、50g/L 甘露醇、60mg/L 甲泼尼龙、5g/L 果糖二磷酸钠、20mg/L 甲基强的松龙、7.5mg/L 米力农、0.0125mg/L 干扰素 α 1b、187.5 mg/L 人血丙种球蛋白、0.15 mg/L 地塞米松、0.04g/L 阿司匹林肠溶片、0.75g/L 安乃近片、0.2g/L 布洛芬颗粒、450mg/L 对乙酰氨基酚缓释片、0.05g/L 尼美舒利片、0.9g/L 赖氨匹林、0.45g/L 肌苷片、0.02mg/L 他克莫司软膏、12.5mg/L 醋酸泼尼松片、0.4g/L 环孢霉素软胶囊、0.1g/L 环磷酰胺片、0.5g/L 阿莫西林、0.6g/L 甲硝唑、0.1g/L 拉米夫定、0.25g/L 齐多夫定、0.02g/L 司他夫定、0.1g/L 奈韦拉平、0.125g/L 依非韦伦、0.6g/L 茚地那韦、0.25g/L 克立芝、0.125g/L 阿巴卡韦、0.1g/L 硫唑嘌呤、1.8g/L 粘蛋白。

【注意事项】

1. 本试剂盒用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本试剂盒说明书, 严格按操作步骤执行; 不使用本试剂盒提供的组分或不按照说明书进行实验将可能导致错误结果。
3. 实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。实验人员必须进行专业培训; 实验过程应分区进行 (试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区), 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段用品不得交叉使用; 各区间人员流动及空气流向应有严格要求, 最大限度避免交叉污染; 实验用消耗品 (如离心管、移液器吸头等) 应有合理的清洁和质检程序, 避免污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。
4. 为了避免样本中任何潜在的生物危害, 检测样品均应视为具有传染性物质, 避免接触到皮肤, 样本的处理应在生物安全柜中操作, 操作中废弃物均应按照医疗废弃物进行无害化处理。核酸提取液 A 有腐蚀性, 如与皮肤接触, 请立即用大量清水冲洗。
5. 操作台、移液器、离心机、耗材等仪器用品应经常用 1.0% 次氯酸钠或稀盐酸擦拭消毒或浸泡。实验房间、超净工作台应定期或每次实验后用紫外灯处理。
6. 手和灰尘是最常见的污染源, 所以操作过程一定要带手套, 勤换手套, 一旦手套接触到样品, 立即更换手套。

【参考文献】

- [1] Kim Y, Hong J, Lee H, et al. Genomotype analysis of adenovims types 3 and 7 isolated during successive outbreaks of lower respiratory tract infection in children. J Clin Microbiol, 2003, 41: 4594-4599.
- [2] Carballal G, Videla C, Espinosa M, et al. Multicentered study of viral acute lower respiratory infection children from four cities of Argentina, 1993-1994. J Medical Virology, 2001, 64: 164-167.
- [3] Jones M S, Harrach B, Ganac R D, et al. New adenovirus species found in a patient presenting with gastroenteritis [J]. J Virol, 2007, 81 (11): 5978-5984.

**技术文件:**

腺病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）产品说明书

文件编号

版本号

生效日期

INS-HS01

B3

2020.07.15

**【基本信息】**

注册人/生产企业：广东和信健康科技有限公司

住所：广州市萝岗区瑞发路1号1栋4楼

邮政编码：510530

电话号码：020-82512529

传真号码：020-82514208-177

公司网址：<http://www.hecin-scientific.cn>

售后服务单位名称：广东和信健康科技有限公司

服务热线：020-82512529

传真号码：020-82514208-177

生产地址：广州市黄埔区瑞发路1号自编（1）栋四层015号房，广州市萝岗区瑞发路1号自编（2）栋四层

生产企业许可证编号：粤食药监械生产许20193323号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20183400426

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2019年7月19日

修改日期：2020年7月10日