

2	预变性	95℃	3 分钟	1
3	变性	94℃	15 秒	40
4	退火，延伸，荧光信号采集	60℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	1 分钟	1

4.2 Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：双击“MxPro”图标打开软件，选择“Quantitative PCR（Multiple Standards）”，点击“OK”；选中试剂所放的孔位，确认与仪器相对应，然后在“Well type”的下拉选框里选择相应的样本类型：“Unknown”（待测样本）、“NTC”（阴性对照）、“Standard”（标准品）等，在“Collect fluorescence data”内的“FAM”和“HEX”通道前划“√”；依次选中每一个“Standard”（标准品）孔，在“Standard quantity”右侧的选项框内依次选择需要定量的通道“FAM”及输入相应的标准品浓度；双击各样本孔，跳出“Well Information”对话框，在“Name”框内输入各样本的唯一编号。
- 2) 反应条件设置：单击进入“Thermal Profile Setup”页面，在此页面设置所需的扩增程序（见下表），确认无误后，将结果保存，点击“RUN”开始扩增检测：

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	3 分钟	40
3	变性	94℃	15 秒	
4	退火，延伸，荧光信号采集	60℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	1 分钟	1

5 结果分析条件设定

5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪（Version 1.4.0）

反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时，基线（Baseline）的起始点（Start）设定在 5~8 之间，终止点（Stop）设定在 12~15 之间，阈值线（Threshold）通常设定在 1000~5000 之间（视具体情况而定）。设定之后，点击“Analyze”（分析）按键，即可从“Report”窗口的“Ct”、“Quantity”处得到各样本的 Ct 值和相应的初始浓度。

5.2 Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值，手动调整基线（Non-adaptive baseline）的起始点（Start）一般设定为 5~8，终止点（Stop）一般设定为 12~15，阈值线（Threshold fluorescence）通常设定在 500~2000 之间（视具体情况而定）。设定之后，可以从“Text report”窗口的“Ct(dRn)”、“Quantity(copies)”处得到各样本的 Ct 值和相应的初始浓度。

6 质量控制

- 6.1 内标：试剂盒中提供了内标，用于监测 PCR 反应中可能出现的抑制情况。
- 6.2 阴性质控品：靶基因通道无 S 型曲线，报告界面无 Ct 值，内标通道有 S 型曲线。
- 6.3 定量标准品：用作阳性质控及绘制标准曲线。靶基因通道有 S 型曲线，且 Ct 值<37；内标通道有 S 型曲线。
- 6.4 标准曲线的相关系数 |R|（|r|）应>0.99，或 R²（r²）应>0.98。
- 6.5 以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【参考值范围】

测定值在 5×10³ copies/mL~5×10⁸ copies/mL 之间的样本，直接报告所测定的数值，测定值在 2×10³~5×10³ copies/mL 之间的样本，直接报告数值，并注明“供参考”，测定值在 0~2×10³ copies/mL 的样本报

告为“低于试剂盒最低检出限(2×10³ copies/mL)”。参考值范围由大量不同浓度的线性参考品的检测结果确定。

【检验结果的解释】

单个样本检测可能出现以下情况：

1. 在内标通道中没有出现 S 型曲线，则检测结果无效，建议重新测定。
2. 在内标通道中出现 S 型曲线，同时在靶基因通道中无 S 型曲线，则检测样本为“低于试剂盒检出下限(2×10³ copies/mL)”。
3. 在内标通道中出现 S 型曲线，同时在靶基因通道中有 S 型曲线，则有如下解释：
 - 1) 测定值在 0~2×10³ copies/mL 的样本报告为“低于试剂盒最低检出限(2×10³ copies/mL)”。
 - 2) 测定值在 2×10³~5×10³ copies/mL 之间的样本，直接报告数值，并注明“供参考”。例：检测结果为 3×10³ copies/mL，报告内容为“3×10³ copies/mL，供参考”。
 - 3) 测定值在 5×10³ copies/mL~5×10⁸ copies/mL 之间的样本，直接报告所测定的数值；
 - 4) 测定值>5×10⁸ copies/mL 的样本，建议将样本稀释至线性范围后重新测定，并根据下面公式计算样本浓度，结果注明为可报告数值。可报告数值(最终样本浓度)=稀释后浓度×稀释倍数
稀释倍数=(样本量+稀释液量)/样本量
4. 最适样本类型、感染类型及感染后的最高病毒滴度时间未经验证，因此，在同一患者分次、多部位采集样本可能会避免假阴性。
5. 不合理的样本采集、转运及处理，样本中的病毒滴度过低均有可能导致假阴性结果。
6. 病毒检测靶序列的变异会导致假阴性结果。
7. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊请结合临床症状和其他检测手段。

【检验方法的局限性】

1. 当样本中被检测核酸浓度低于试剂盒的最低检出限时，可能会导致假阴性结果。
2. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，很容易出现假阳性结果。因此，PCR 临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
3. 样本中残留的蛋白质成分对 PCR 扩增有抑制作用，在样本处理的取上清时应避免吸入白色沉淀物质。

【产品性能指标】

1. 最低检出限：根据产品分析性能评估结果，本试剂盒的最低检出限为 2×10³ copies/mL。
2. 线性检测范围：5×10³~5×10⁸ copies/mL。
3. 分析特异性：
 - 3.1 对于可能存在检测干扰的病原体，包括甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、梅毒、JC 病毒、单纯疱疹病毒 I、单纯疱疹病毒 II(HSVII)、水痘带状疱疹病毒(VZV)、EB 病毒、疱疹病毒 6 型、疱疹病毒 7 型、人巨细胞病毒、EB 病毒、疱疹病毒 6 型、疱疹病毒 7 型、结核杆菌、人乳头瘤病毒 HPV(6, 11, 16, 18)、沙眼衣原体、淋球菌、解脲脲原体、肺炎支原体、肺炎衣原体、肠道病毒 71 型、柯萨奇 a16 型，检测结果均为阴性。
 - 3.2 干扰物质：样本中常见干扰物质高浓度的胆红素（268.3μmol/L）、甘油三酯（65.33 mmol/L）、血红蛋白（162g/L）对 PCR 结果无明显干扰。
4. 精密度：同一批试剂对高低浓度的两个样本各进行 10 次重复检测，检测浓度对数值的变异系数(CV×100%)≤5%（n=10）。
5. 临床试验：

临床实验结果显示：本试剂盒的尿液样本灵敏度为 98.31%，特异性为 100%，血液样本灵敏度为 99.22%，特异性为 99.79%。

【注意事项】

1. 开始检测前请仔细阅读本说明书。
2. 本品仅用于体外诊断。
3. 使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。临床基因扩增实验室应该分为以下三个区域、并且各个区域应具有以下表格中的必备物品：PCR 准备区-PCR 反应体系配制区；样本处理区-样本处理、加样区；检测区-PCR 扩增、荧光检测、结果分析区。各区的仪器、耗材、试剂等独立专用。

PCR 准备区	样本处理区	检测区
迷你离心机 旋涡混合器 冰箱（4℃；-20℃） 移液器一套 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套，无菌吸头、离心管、PCR 反应管 紫外灯 专用工作服和办公用品	生物安全柜 台式高速离心机 旋涡混合器 冰箱（4℃；-20℃） 移液器一套 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套，无菌吸头、离心管 专用工作服和办公用品	荧光定量 PCR 仪 紫外灯 专用工作服 办公用品 无粉乳胶手套

4. 操作人员应经过以下专业培训，具有合格的操作技能方能上岗。
 - 4.1 本产品说明书要求的操作培训。
 - 4.2 临床基因扩增实验室各个区域仪器设备的操作培训。
 - 4.3 《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》法规的安全防护培训。
5. 请自备移液器，振荡器，迷你离心机，离心机，干式恒温仪或水浴锅，无菌吸头、离心管，PCR 反应管及无粉一次性乳胶手套（经常更换）。
6. 样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。
7. 样本操作和处理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》。
8. 实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
9. 试剂盒中的阳性质控品是体外纯化的质粒，无传染性，但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
10. 样本核酸提取完毕后，建议立即进行检测，否则请保存于-20℃，并且在 24 小时内进行检测。
11. 实验完毕后使用 10%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪等仪器表面，然后紫外灯照射 25-30 分钟。
12. 不同批号试剂盒中各组份不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒，不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【参考文献】

- [1] Comar M, Zanotta N, Bovenzi M, Campello C. JCv/BKV and SV40 viral load in lymphoid tissues of young immunocompetent children from an area of north-east Italy. J Med Virol. 2010 Jul; 82(7):1236-40.
- [2] Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BKV. Cell. 1979 Dec;18(4):963-77.

【基本信息】

生产企业名称：北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司
住所：北京市北京经济技术开发区康定街 1 号 14 号楼 3 层 1 室
联系方式：010-67817816
售后服务单位：北京鑫诺美迪基因检测技术有限公司
联系方式：010-67817816
生产地址：北京市北京经济技术开发区康定街 1 号 14 号楼 2 层，北

京市北京经济技术开发区康定街 1 号 10 号楼 2 层

生产许可证编号：京食药监械生产许 20090031 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163402071

【说明书核准及修改日期】2017.10.26

夏邑氏