

EB 病毒核酸检测试剂盒（荧光定量 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：EB 病毒核酸检测试剂盒（荧光定量 PCR 法）

【包装规格】

50 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测全血样本中 EB 病毒核酸 DNA。

本试剂盒目标人群为各种可能接受 EB 病毒核酸感染检查的人群，主要包括原发性 EB 病毒感染（传染性单核细胞增多症）、慢性 EB 病毒感染、EB 病毒感染相关的恶性肿瘤、免疫功能低下或者接受免疫抑制剂治疗等人群。本试剂盒检测结果应结合目标人群的临床表现和其他诊断指标，可用于 EB 病毒感染的辅助诊断、治疗监测，不得作为确诊或排除的唯一依据。

EB 病毒（Epstein-Barr Virus, EBV）是双链 DNA 病毒，属于疱疹病毒科， γ 亚科。人感染 EB 病毒后终身潜伏感染，约 90% 以上的成人血清 EBV 抗体阳性。EB 病毒是一种重要的肿瘤相关病毒，与鼻咽癌、淋巴瘤、胃癌、移植后淋巴增殖症等多种肿瘤的发生密切相关，研究显示全世界受 EB 病毒相关肿瘤影响的人口达到 1%。多个肿瘤诊疗指南中也提出检测鼻咽癌患者和部分淋巴瘤患者的 EB 病毒 DNA 载量可能反映肿瘤预后和治疗疗效的差异。非肿瘤性 EB 病毒感染疾病主要包括传染性单核细胞增多症、慢性活动性 EBV 感染、EB 病毒相关噬血淋巴组织细胞增生症等症状。临床或实验室诊断 EB 病毒感染的检测方法有酶联免疫法、荧光定量 PCR 法和免疫荧光法等。

检验人员应具备 PCR 检测操作资质。由于 EB 病毒属于危害程度第三类的病原微生物，因此在保证安全的前提下，对临床和现场的未知样本检测操作应在生物安全 II 级或以上防护级别的实验室进行。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 荧光探针技术对全血样本中 EB 病毒核酸 DNA 进行定量检测。靶标基因为 EB 病毒的抗核抗原的前导蛋白基因（EBNA-LP）片段，该片段为高度特异性的保守区域。经过与 NCBI 数据库和实验比对，筛选出符合检测要求的引物探针组合，探针用 5'FAM/3'BHQ1 标记。同时以人 β -actin 基因的保守区域设计引物探针，探针用 5'HEX/3'BHQ1 标记，作为试剂盒内标，实现从样本质量、样本抽提及核酸扩增的全程监测。

本试剂盒将反应体系分为 2 管，包括 PCR 反应液（引物探针、dNTP、镁离子等）和混合酶液（DNA 聚合酶和 UNG 酶）。质控品包括强阳、弱阳及阴性质控品，由含 EB 病毒基因的假病毒和含 β -actin 基因的假病毒的制备，其中强阳性和弱阳性质控品应有 FAM 和 HEX 信号扩增，阴性质控品有 HEX 信号扩增。同时设置 4 个已知浓度的定量标准品，用于标定样本中 EB 病毒浓度。PCR 扩增时，探针与靶标序列结合，探针的 5'端荧光报告基团被 Taq 酶的外切核酸酶活性切断，进而远离淬灭基团，产生荧光信号。荧光定量 PCR 仪器在每次退火延伸阶段的末端检测荧光信号，自动绘制出实时扩增曲线，计算出样本 Ct 值（每个反应管内的荧光信号到达设定的阈值时所经历的循环数）。4 个定量标准品设置为标准品并输入相应浓度后，PCR 软件自动绘制定量标准品扩增 Ct 与浓度 Log10 值的标准曲线，根据样本中 EB 基因扩增 Ct 值，计算得到样本中的 EB 浓度。

在 PCR 检测体系中引入尿嘧啶-N-糖基化酶（UNG 酶）/dUTP 防污染系统，避免假阳性结果的出现。PCR 检测中最常见、最重要的污染物是 PCR 产物，本试剂盒以 dUTP/dTTP 取代 dTTP，导致 PCR 产物是含有 dU 的 DNA 链，在 PCR 开始的 42℃ 的保温步骤，UNG 酶即可将反应体系中已有的 U-DNA 污染物中的尿嘧啶碱基降解，UNG 酶在随后的 94℃ 2min 变性条件下被灭活，不会再降解新扩增的产物 U-DNA 从而保证扩增结果的特异性，准确性。

本试剂配套使用的是江苏默乐生物科技股份有限公司核酸提取纯化试剂（备案号：苏泰械备 20170120），是利用红细胞裂解液裂解全血样本中的红细胞后，在表面活性剂和加热的作用下，释放出核酸，同时利用 Chelex-100 树脂吸附液体中的金属离子等杂质，在离心后得到纯化的核酸。

【主要组成成分】

序号	标签	成分	规格
1	PCR 反应液（EB）	2.56mM 的镁离子、0.51mM 的磷酸核苷、2.05 μ M 引物、0.51 μ M 的探针和纯化水	1 管（1200 μ L/管）
2	混合酶液（EB）	4U/ μ L 的 DNA 聚合酶和 0.2U/ μ L 的 UNG 酶	1 管（30 μ L/管）
3	强阳性质控品（EB）	EB 病毒基因的假病毒和含 β -actin 基因的假病毒	1 管（500 μ L/管）
4	弱阳性质控品（EB）	EB 病毒基因的假病毒和含 β -actin 基因的假病毒	1 管（500 μ L/管）
5	定量标准品 1（EB）	EB 病毒基因的质粒和 β -actin 基因的质粒	1 管（500 μ L/管）
6	定量标准品 2（EB）	EB 病毒基因的质粒和 β -actin 基因的质粒	1 管（500 μ L/管）

7	定量标准品 3 (EB)	含 EB 病毒基因的质粒和 β -actin 基因的质粒	1 管 (500 μ L/管)
8	定量标准品 4 (EB)	含 EB 病毒基因的质粒和 β -actin 基因的质粒	1 管 (500 μ L/管)
9	阴性质控品 (EB)	含人 β -actin 基因的假病毒	1 管 (500 μ L/管)

其他相关试剂：江苏默乐生物科技股份有限公司核酸提取纯化试剂（备案号：苏泰械备 20170120），无需配套的核酸提取仪器。

注：本试剂盒定量标准品溯源至中国食品药品检定研究院制备的 EB 病毒核酸检测试剂国家标准品（批号 370040-202001）（溯源至国际标准品：1st WHO International Standard for Epstein-Barr Virus for Nucleic Acid Amplification Techniques（NIBSC code: 09/260））。

不同批号试剂盒中各组分不能互换。

每批定量标准品 1 (EB) ~ 定量标准品 4 (EB) 浓度见定量标准品浓度标签。

【储存条件及有效期】

避光密闭保存于-（20±5）℃，有效期 18 个月。

采用泡沫箱加干冰或冰袋（泡沫箱尺寸 54cm*51cm*42cm（壁厚 6cm），中间放置试剂盒，上面、下面及中间空余部分用大、小冰袋进行填充）密封进行运输，10 天内稳定性良好；反复冻融不超过 4 次；试剂盒开瓶后将 PCR 反应液（EB）、混合酶液（EB）按照比例混合后在（2~8）℃存放不超过 6 天，建议一次性使用。

生产日期和失效日期见试剂盒外标签。

【适用仪器】

本试剂盒适用于 ABI 7500 和上海宏石 SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

样本采集的对象是EB病毒感染的患者或疑似患者。采集的样本为全血样本。

- 1 全血样本的采集：一次性针筒抽取病人静脉血1mL，置于无菌的一次性EDTA抗凝试管中，上下颠倒数次。
- 2 全血样本的保存：2~8℃保存14天，-（20±5）℃保存期限是6个月，样本冻融次数不超过2次。
- 3 样本采集、运输和保存过程中要附有必要的信息，如编号、发病日期和采集日期。
- 4 对于高于线性范围的样本，处理方法参照【检验结果的解释】中7.5。
- 5 全血样本抽提核酸的保存：-（20±5）℃保存期限是6个月，2~8℃保存4天，冻融次数不超过11次。

【检验方法】

1 扩增试剂准备（PCR 前准备期）

建议按照本试剂盒推荐的核酸提取纯化试剂（备案号：苏泰械备 20170120）说明书提取病毒核酸。需要进行核酸提取的样本种类包括：

- 1.1 临床样本：待检测的临床样本400 μ L；
- 1.2 质控品和标准品：试剂盒中强阳性质控品（EB）、弱阳性质控品（EB）、阴性质控品（EB）和 4 个定量标准品（EB）分别取 100 μ L 与 100 μ L 裂解液（核酸提取纯化试剂，备案号：苏泰械备 20170120）混合，95℃加热 10min，12000rpm 离心 10min，转移至清至新的 EP 管中，并做好标记。

2 扩增试剂准备（PCRⅠ室）

从试剂盒中取出PCR反应液（EB），在冰上或（2~8）℃融化；取出混合酶液（EB），将所有组分轻微摇晃混匀并低速简短离心。每人份按照下表进行PCR反应体系的配置。

试剂	PCR反应液（EB）	混合酶液（EB）
用量	19.5 μ L	0.5 μ L

计算好各试剂使用量，加入一个适当体积离心管中，充分混匀，简短离心。PCR反应体系的总量应满足的人份数包括：n管临床样本的个数、1管强阳性质控品、1管弱阳性质控品、4管定量标准品、1管阴性质控品和1个PCR阴性对照。总反应管数=n+8。

PCR反应体系配置完毕，进行PCR反应体系的分装，在每一个PCR反应孔加入20.0 μ L PCR反应体系，分装完毕，转移至PCRⅡ室。

3 加样（PCRⅡ室）

在装有PCR反应体系的PCR反应孔中加入“1 扩增试剂准备（PCR前准备期）”步骤制备的核酸，每一份核酸的添加量是20.0 μ L/孔，PCR阴性对照孔中加入20.0 μ L无菌无RNase水或生理盐水。

4 PCR 反应（检测区）

将反应管放入荧光PCR检测仪中，循环参数设定如下：

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
----	-----	-------	---------------

1	1	42	02:00
2	1	94	02:00
3	40	94	00:10
		*58	01:00

PCR 反应总体积为 40.0μL，荧光信号的收集定为 FAM（EB 病毒）荧光和 HEX（内标）荧光；“*”数据的采集定第三步的 58℃。采用 ABI7500 仪器时，请将“Quencher”一栏设置为“none”，“passive reference”一栏选为“none”。

【阳性判断值】

本试剂盒以湖南圣湘生物科技有限公司生产的 EB 病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)(注册证书编号:国械注准 20173400077)作为对照试剂盒，受试者人群主要包括原发性 EB 病毒感染（传染性单核细胞增多症）、慢性 EB 病毒感染、EB 病毒感染相关的恶性肿瘤、免疫功能低下或者接受免疫抑制剂治疗，利用 ROC 曲线分析本试剂检测结果，结合各切点的灵敏度和特异度，选择 Youden 指数较大的切点为最佳临界点，最终确定本试剂盒 FAM 荧光的参考 Ct 值是 37.92，通过梯度稀释法确定本试剂盒内标 HEX 的参考 Ct 值为 35.00。

【检验结果的解释】

将 4 个定量标准品的浓度(见试剂盒盖内标签)输入对应孔的 FAM 荧光通道,分析图像后调节 Baseline 的 Start 值、End 值和 Threshold 值（可自行调节，Start 值位于 3.00~15.00 之间，End 值位于 5.00~20.00 之间），调整阴性对照的扩增曲线使其平直或低于阈值线，再进行结果分析，具体如下：

- 1 PCR 阴性对照 FAM 荧光 Ct 值应为阴性，HEX 荧光 Ct 值>35.00 或无典型扩增曲线；
- 2 阴性质控品 FAM 荧光 Ct 值应为阴性，HEX 荧光 Ct 值≤35.00；
- 3 弱阳性质控品的 EB 病毒核酸 DNA 定量结果应约为 2×10²~9×10⁴IU/mL，Ct 值应为 28.00~33.00 之间，HEX 荧光 Ct 值≤35.00；
- 4 强阳性质控品的 EB 病毒核酸 DNA 定量结果应约为 2×10⁵~9×10⁷IU/mL，Ct 值应为 18.00~23.00 之间，HEX 荧光 Ct 值≤35.00；
- 5 标准曲线相关系数r|应≥0.9800。
- 6 样本孔均应出现内标（HEX 荧光）的典型扩增曲线；
- 7 以上 6 个条件需在同一次试验中同时满足，否则认为检测结果不能正确反映样本实际情况，需重新进行检测。满足以上条件后方可进行以下结果判断：
- 7.1 仪器显示 Undetermined 表示待检样品为阴性。
- 7.2 对于测定 Ct 结果≤37.92，同时内标 HEX 荧光 Ct 值≤35.00，报告为 EB 病毒 DNA 阳性。
- 7.3 对于测定 Ct 结果>37.92，同时内标 HEX 荧光 Ct 值≤35.00，报告为 EB 病毒 DNA 低于试剂盒检测下限。
- 7.4 结果显示样本 EB 病毒核酸 DNA 浓度在 1×10²IU/mL~1.0×10⁷IU/mL 时，定量结果有效，可直接报告相应的定量数值。
- 7.5 结果显示样本浓度大于 1.0×10⁷IU/mL，可直接报告为大于 1.0×10⁷IU/mL，也可将核酸样本做稀释后重新测定，测定后根据稀释倍数校准。
- 7.6 结果显示典型扩增曲线，EB 病毒核酸 DNA 浓度低于 100IU/mL 时，检测结果有效，定量数值仅供参考。
- 7.7 待检样本EB病毒 DNA的浓度小于50IU/mL时，不能100%检出。
- 8 试剂盒检测扩增图及分析示例。

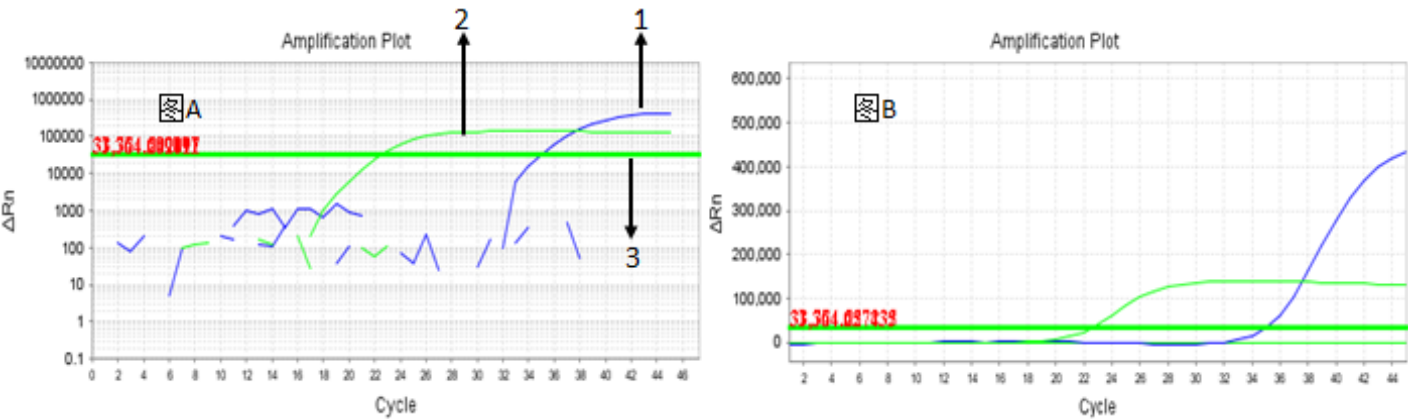


图 A 为指数扩增图，其中 “1”和“2”分别为 EB 病毒和 β-actin 内标的扩增曲线； “3”为阈值线；图 B 为线性扩增图。

【检验方法的局限性】

本试剂盒的检测结果仅供临床参考，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，不得作为患者临床诊治或管理的唯一依据。阴性检测结果仅仅表明样本中病毒滴度低于本试剂盒的最低检出限，不能排除 EB 病毒感染的可能性。不合理的样本采集、转运及处理、样本中病毒浓度过低均有可能导致假阴性结果。EB 病毒待测靶序列的变异或其它原因导致的序列改变可能会导致假阴性结果。对于突发的新型 EB 病毒，其最适样本类型及感染后的最佳采样时间未经验证，因此，在同一患者分次、多部位采集样本会降低假阴性结果的可能性。

【产品性能指标】

1 最低检出限为 50IU/mL，定量限为 100IU/mL；最低检出限的确定是将 EB 病毒国际参考品进行梯度稀释，重复检测 25 次，将具有 95%以上阳性检出率的病毒水平作为最低检测限；定量限的确定是用经标定浓度 EB 临床样本进行梯度稀释后，重复检测 25 次，以 22 次检测浓度与国际参考品标示浓度的绝对偏差不超过±0.5 个对数数量级的浓度作为定量限。最低检出限和定量限的验证是用已标定浓度的临床样本分别稀释至最低检出限和定量限，重复测定 25 次。

2 本试剂盒线性范围是 1×10²IU/mL~1.0×10⁷IU/mL，相关系数r²≥0.9800。

3 精密度：3 批试剂检测阴性样本、临界阳性样本、中等浓度阳性样本，由 2 人在 20 天内，不同仪器间（地点）合计进行 40 次测试，检测所用仪器为 ABI7500、上海宏石 SLAN-96P 实时荧光定量 PCR 仪。结果表明，阴性样品的检测结果都为阴性；批内：中等浓度阳性样本 CV（%）小于 6%，临界浓度阳性样本 CV（%）小于 12%；批间：中等浓度阳性样本 CV（%）小于 5%，临界浓度阳性样本 CV（%）小于 7%；日内、日间：中等浓度阳性样本 CV（%）小于 10%，临界浓度阳性样本 CV（%）小于 20%；仪器间：中等浓度阳性样本 CV（%）小于 5%，临界浓度阳性样本 CV（%）小于 10%；实验室间、操作者间：中等浓度阳性样本 CV（%）小于 5%，临界浓度阳性样本 CV（%）小于 5%。

4 分析特异性：包括交叉反应和干扰物质。

4.1 交叉反应：与感染部位相似或者感染症状相似的其他病毒和细菌，其它相关病原体均无交叉反应，相应浓度的病原体的测定结果如下：

病原体名称	浓度
水痘-带状疱疹病毒	>10 ⁷ copies/mL
乙型肝炎病毒	>10 ⁷ IU/mL
巨细胞病毒	>10 ⁷ copies/mL
人疱疹病毒 6 型	>10 ⁷ copies/mL
人疱疹病毒 7 型	>10 ⁷ copies/mL
人疱疹病毒 8 型	>10 ⁷ copies/mL
单纯疱疹病毒 1 型	>10 ⁷ copies/mL
单纯疱疹病毒 2 型	>10 ⁷ copies/mL
甲型流感病毒 H3N2 亚型	>10 ⁷ copies/mL
乙型流感病毒 Yamagata 亚型	>10 ⁷ copies/mL
大肠杆菌	>10 ⁸ copies/mL
铜绿假单胞菌	>10 ⁸ copies/mL
麻疹病毒	>10 ⁷ copies/mL
风疹病毒	>10 ⁷ copies/mL
腮腺炎病毒	>10 ⁷ copies/mL
金黄色葡萄球菌	>10 ⁸ copies/mL
白色念珠菌	>10 ⁸ copies/mL
腺病毒 3 型	>10 ⁷ copies/mL

4.2 干扰物质：检验样本中添加以下浓度的药物或干扰物质，不会影响到试剂盒对样本检测结果的判定：0.45mg/L 阿奇霉素、2.00mg/L 利巴韦林、18.30mg/L 头孢丙烯、20.00mg/L 胆红素、7.50mg/L 阿莫西林、2.00mg/mL 人白蛋白、1.00mg/mL 甘油三酯、8.00mg/mL EDTA 抗凝剂、150g/L 血红蛋白、1*10¹⁰ 个/L 白细胞、17g/L IgG、1.7mg/mL IgM、3.9mg/mL IgA。

5 临床试验：

本次试剂盒（考核试剂）与湖南圣湘生物科技有限公司的《EB 病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）》（对照试剂）对 665 例临床全血样本对比检测，将对照试剂 EB 浓度测定值 ≥ 400 copies/mL 和考核试剂 EB 浓度测定值 ≥ 100 IU/mL 的对象 192 例纳入定量分析，受试者人群主要包括原发性 EB 病毒感染（传染性单核细胞增多症）、慢性 EB 病毒感染、EB 病毒感染相关的恶性肿瘤、免疫功能低下或者接受免疫抑制剂治疗。经直线回归分析发现直线回归拟合方程为 $Y=0.974X+0.096$ ，斜率和截距的点估计值和 95%置信区间分别是 0.974 (0.946, 1.002) 和 0.096 (0.014, 0.178)；经直线相关分析发现 Pearson 积差相关系数 r 为 0.980，相应地，决定系数 r^2 为 0.961；Bland-Altman 图分析发现仅有 3.65%（7/192）的样本测定比值在一致性界限范围外。665 例全血样本检测结果阴阳性判定的一致性分析，考核试剂 EB 病毒检测的阳性符合率 94.95% (95%CI 92.48%, 96.64%)、阴性符合率 94.76% (95%CI 91.07%, 96.98%)、总符合率 94.89% (95%CI 92.94%, 96.32%)，Kappa 值为 0.888 (95%CI 0.851, 0.925)。

【注意事项】

- 1 整个检测过程应分三区进行，一区进行试剂准备；二区进行标本处理、反应体系的配制；三区进行扩增、荧光检测和结果分析。各区的仪器、设备和工作服独立使用，以防污染。
- 2 在操作中，应时刻注意避免 RNase 和 DNase 的污染，应使用不含荧光物质的一次性手套（经常替换）、一次性薄壁进口 200 μ L PCR 管（或 96 孔 PCR 板加光学贴膜）、移液器头（带滤嘴自卸式），不能用手直接触摸反应管。
- 3 处理标本时应使用生物安全柜，以保证操作人员安全和防止对环境的污染。实验中的有害有毒标本及试剂应妥善放置，专人保管；废弃物应置于专门容器中妥善处理。操作台、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备应经常用 1.0%次氯酸钠及/或 70%乙醇擦拭消毒。实验房间、超净工作台应定期及每次实验后用紫外灯处理。
- 4 离心管装试剂在使用前应充分融化，混匀，离心数秒，使液体集中在离心管底部。配制反应体系时应注意：所有液体的混匀尽量要在漩涡混合器上进行，不可用移液器吹打，以免产生气泡，反应体系配制完毕低速离心数秒。试剂盒请在保质期内使用。不同批号的试剂请勿混用。
- 5、临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员，应严格按照说明书要求进行操作。
- 6、本试剂盒不包含人源组分。

【参考文献】

- [1] Young, L.S., L.F. Yap, and P.G. Murray, Epstein-Barr virus: more than 50 years old and still providing surprises. Nature Reviews Cancer, 2016. 16(12): p. 789-802.
- [2] Hakim, H., et al., Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood. Journal of clinical microbiology, 2007. 45(7): p. 2151-2155.
- [3] Wadowsky, R.M., et al., Measurement of Epstein-Barr virus DNA loads in whole blood and plasma by TaqMan PCR and in peripheral blood lymphocytes by competitive PCR. Journal of clinical microbiology, 2003. 41(11): p. 5245-5249.
- [4] Arvey, A., et al., An atlas of the Epstein-Barr virus transcriptome and epigenome reveals host-virus regulatory interactions. Cell host & microbe, 2012. 12(2): p. 233-245.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：江苏默乐生物科技股份有限公司
住 所：地址：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F-7F 东
联系方式：电话：0523-86080606 邮编：225300
售后服务单位名称：江苏默乐生物科技股份有限公司
联系方式：电话：0523-86080606 邮编：225300
生产地址：江苏省泰州市健康大道 805 号 G116 幢 6F、7F 东
生产许可证编号：苏药监械生产许 20080073 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223401598

【说明书核准及修改日期】2022.12.12

变更记载

版本号	生效日期	本次变更原因、依据及详细变更内容
0.0	2022.12.12	新体系文件