

BK 病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

- 【产品名称】BK 病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）
- 【包装规格】24 人份/盒
- 【预期用途】

本产品用于体外定量检测人体晨尿样本中的 BK 病毒（BKV）核酸。BKV 是乳头状多瘤空泡病毒科，多瘤病毒家族的一种亚型，原发感染多在 10 岁之前，传播机制仍不清楚，可能经由呼吸道或口腔传播，健康成人中的感染率高达 82％。由于健康成人免疫功能正常，绝大部分终生都不会出现明显的 BKV 感染症状或体征，但其可一直潜伏在泌尿系统上皮细胞中。当机体免疫力低下，尤其是实体器官移植后，潜伏在尿路上皮和肾小管上皮中的 BKV 被激活，开始高水平复制，大量复制的病毒颗粒从尿液中排泄，造成 BKV 尿症(BKV viruria)。在肾移植受者中，随着病程进展，BKV 会进入肾小管上皮细胞细胞核并复制大量子代病毒，引起细胞坏死、松解，使组织发生免疫性、炎症性浸润；当肾小管上皮细胞脱落和局部基底膜暴露时，病毒开始破坏肾小管毛细血管进入血液，形成 BKV 血症（BKV viruria）。BKV 在血液中持续高载量表达，进一步破坏移植肾组织导致肾小管萎缩和间质纤维化，最终形成 BKVN。定量检测 BK 病毒的含量，可用于 BK 病毒感染的辅助诊断。

【检验原理】本产品选取 BKV 基因组中一个相对保守的区域，设计特异性引物及探针，在样本核酸提取纯化之后采用实时荧光 PCR 监测整个 PCR 过程荧光信号的变化，并通过定量标准品对未知样本的病毒含量进行定量分析。同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针通道（FAM 通道）无冲突的另一检测通道（HEX/VIC 通道）。PCR 检测使用尿苷酶（UDG）防污染体系，经加热可以选择性地降解含 U 碱基的核酸片段，以防止先前 PCR 扩增产物的污染。

【主要组成成分】

表 1 主要组成成分

序号	组分名称	主要成分	规格及装量
1	裂解液	胍盐溶液	4.8mL×1 瓶
2	磁珠	硅基磁珠	480μL×1 管
3	洗液 1	盐溶液	6.6mL×1 管
4	洗液 2	纯水	3.6mL×1 瓶
5	洗脱液	Tris	1.2mL×1 管
6	蛋白酶 K	蛋白酶 K	240μL×1 管
7	助沉剂	助沉剂	96μL×1 管
8	BKV 引物探针混合液	引物、探针	120μL×1 管
9	BKV PCR 反应液	Taq 酶、UDG 酶、dNTP、Mg ²⁺	600μL×1 管
10	BKV 内标质控品	内标质粒	120μL×1 管
11	BKV 阴性质控品	生理盐水	600μL×1 管
12	BKV 临界阳性质控品	灭活阳性样本	600μL×1 管
13	BKV 阳性质控品	灭活阳性样本	600μL×1 管
14	BKV 定量标准品 I	灭活阳性样本	600μL×1 管
15	BKV 定量标准品 II	灭活阳性样本	600μL×1 管
16	BKV 定量标准品 III	灭活阳性样本	600μL×1 管
17	BKV 定量标准品 IV	灭活阳性样本	600μL×1 管

注 1：试剂盒各组成成分均不得与其它产品或不同批号产品中的相应组成成分进行互换。

注 2：自备试剂包括：异丙醇、无水乙醇、生理盐水。

注 3：试剂盒以外必需的设备及耗材：荧光定量 PCR 仪、干式恒温仪、旋涡混合器、生物安全柜、磁力架（磁分离器）、移液器及吸头、离心管、

高速离心机、微型离心机、PCR 反应管、无粉乳胶手套、一次性口罩。

【储存条件和有效期】

试剂盒生产日期，失效日期见外包装盒
磁珠、裂解液、洗液 1、洗液 2 与洗脱液请于 10～30℃条件下避光保存，注意使用后拧紧瓶盖，防止有效成分挥发。其余组分于-20℃±5℃避光保存，效期 12 个月，产品失效期详见外包装。

开瓶后冻融次数及稳定性要求：开瓶后稳定保存不超过 3 个月，反复冻融次数不超过 3 次。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪、Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪、罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

- 样本类型：晨尿
- 样本采集：留取中段晨尿 5～20mL 密封送检。
- 样本保存：样本在 2～8℃保存不超过一周，-20℃±5℃条件下可以保存 6 个月。
- 运输：运输过程中应将样本视作潜在的传染源，密封冷冻运输，避免解冻和漏液。

【检验方法】

1. 首次使用注意事项

- 1.1 裂解液中加入 2.6mL 异丙醇，充分混匀后即可使用。若摇匀后仍有不溶物，请于 70℃下温育至溶解，冷却至室温后即可使用。
 - 1.2 洗液 1 中加入 5.85mL 无水乙醇，充分混匀后即可使用。
 - 1.3 洗液 2 中加入 9.1mL 无水乙醇，充分混匀后即可使用。
- 完成以上步骤后请注意标记。

2. 样本处理

- 2.1 将尿液送检管振荡 15s，彻底混匀后立即取 1mL 至 1.5mL 离心管中（若样本不足 1mL，请用生理盐水稀释至 1mL，并记录所添加生理盐水体积），13000 rpm 离心 10min 后小心弃去上清 950μL，注意避免触碰离心管底部。

注：BKV 阴性质控品、BKV 临界阳性质控品、BKV 阳性质控品及定量标准品 I～IV：融化并振荡 15s 混匀后取 200μL 各加到 1.5mL 离心管中，补加生理盐水至 1mL，振荡 15s，13000 rpm 离心 10min 后小心弃去上清 950μL，其余步骤同 2.2～2.7。

- 2.2 向离心管内加入 10μL 蛋白酶 K、4μL 助沉剂、300μL 裂解液，20μL 磁珠（每次吸取前需颠倒或使用移液器吹吸混匀磁珠），5μL 内标质控品，振荡混匀各离心管 5s，于室温轻柔颠倒混匀 10min，使磁珠和核酸充分结合。

- 2.3 瞬时离心 10s 后将离心管放在磁分离架上，颠倒 2 次冲洗粘附在管盖上的磁珠，静置 1min 后弃去上清液，并注意吸弃管盖残余液体。

- 2.4 加入 500μL 洗液 1，振荡 5s 使磁珠重新悬浮，瞬时离心 10s 后置于磁分离架上，静置 1min 后弃去上清液。

- 2.5 加入 500μL 洗液 2，振荡 5s 使磁珠重新悬浮，瞬时离心 10s 后置于磁分离架上，静置 1min 后弃去上清液，并再次吸弃管底残余液体，晾干 5min。

- 2.6 加入 50μL 洗脱液，用移液器缓慢吹打管壁上的磁珠使之浸于洗脱液中，55℃温育 10min，期间轻轻晃动溶液两次。

- 2.7 将离心管置于磁分离架上静置 1min，磁分离后及时将上清液转移至新的离心管。提取完的 DNA 建议立即进行检测，否则请于-20℃±5℃保存。

3. PCR 试剂配制

- 3.1 检测反应设置阴性质控、临界阳性质控、阳性质控及定量标准品 I～IV，每孔均设有内标以监控提取步骤及体系对 PCR 反应可能存在的抑制。

3.2 配制过程

- 1) 提前 30min 将于冷冻保存的试剂取出，室温融化，使用前振荡 5s，瞬时离心 10s。
- 2) 确定反应数 N，N=待检样本数（n）+质控品数（7）+1。计算如下：

表 2 PCR 体系配制

试剂	BKV 引物探针混合液（μL）	BKV PCR 反应液（μL）
A	5×N	25×N

- 3) 取离心管配置反应体系，试剂全部加入后振荡 5s，瞬时离心 10s。

- 4) 然后将上述混合液按 30μL/管分装至 PCR 反应管中备用。

4. 加样

将 BKV 阴性质控品、BKV 临界阳性质控品、BKV 阳性质控品、BKV 定量标准品（I、II、III、IV）和待测样本的 DNA 提取液各 20μL 分别加入对应的 PCR 反应管中，盖紧管盖，瞬时离心 10s 将管壁上的液体全部甩至管底，如有气泡，轻弹、离心直至气泡去除，然后立即进行 PCR 反应。

5. PCR 扩增程序设置

5.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪（Version 2.3）

- 1) 面板设置：双击“7500 System Software”图标打开软件，单击“Advanced Setup”，进入“Experiment Properties”界面，对实验进行命名。选择机型为 7500（96 Wells），选择实验类型为“Quantitation-Standard Curve”，选择荧光收集方式为“TaqMan® Reagents”。选择反应时长，单击“Plate Setup ”进入“Define Targets and Samples”编辑界面：在“Define Targets”对话框内，根据需要单击“Add New Target”可添加多个 Targets，在“Target name”中输入相应的编号名称，将“Reporter”改为“FAM”及“VIC”，将“Quencher”改为“None”；在“Define Samples”对话框内，根据需要单击“Add New Sample”可添加多个 Samples，在“Sample name”中输入相应编号名称。单击打开“Assign Targets and Samples”编辑界面：在“View Plate Layout”界面选中样本所放的孔位，确认与仪器相对应；在“Assign Target（s） to the selected wells”对话框中，将对应的 Target 划“√”，并在“Task”栏内选择相应的样本类型：“U”（待测样本）、“S”（标准品）、“N”（阴性对照），对样本类型为“S”的单孔，将定量标准品对应的浓度输入“Quantity”；在“Assign Sample（s） to the selected wells”对话框中，将对应的 Sample 划“√”；在“Select the dye to use as the passive reference”对话框界面中选择“（none）”。
- 2) 反应条件设置：单击“Run Method”进入反应条件设置面板，编辑所用扩增程序（见表 3），并在“Reaction Volume Per Well”内输入“50”；点击“Add Stage”可以选择“Holding”或者“Cycling”，其中“Holding”为添加一个温度步骤，“Cycling”为添加一个可循环的若干温度步骤；点击“Add Step”可以选择“Before”或者“After”，即可在一个 Stage 的前或后添加一个 step；在“Number of Cycles”可以更改为相应的循环数。确认无误后，点击“Start”后将结果保存，即可开始扩增检测。

表 3 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	5min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火，延伸	60℃	35s	
5	变性	94℃	15s	35
6	退火，延伸，荧光信号采集（FAM，VIC/HEX）	60℃	35s	
7	仪器冷却	25℃	1min	1

5.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：双击“Bio-Rad CFX Manager”图标打开软件，单击“PrimePCR”，选择“Probe”进入设置界面。单击“Plate”下的“Edit Selected”对荧光收集通道标准品浓度等进行设置：在“Target Name”选择荧光收集通道“FAM”和“VIC”；单击“Sample Type”下拉菜单选择样本类型，如“Unknown”（待测样本）、“Standard”（标准品）、“NTC”（阴性对照）等；单击“Experiment Settings”对“Targets”和“Samples”进行编辑修改。对样本类型为“Standard”的单孔，分别在“Concentration”依次输入标准品浓度并勾选，设置结束后点击“OK”。
- 2) 反应条件设置：单击“Protocol”下的“Edit Selected”反应体系大小及编辑所用扩增程序（见表 3），直接点击温度和时间即可对温度步骤中的温度及保持时间进行修改；点击“Insert Step”在程序中增加一个温度步骤；点击“Add Plate Read to Step”，在程序中指定获取荧光数据的步骤；点击“GOTO”步骤的重复次数，改变程序中的循环次数；点击“Delete Step”在程序中删除选中的步骤。设置完成后，单击“Start Run”后，选择文件保存的位置并编辑文件名后，即可进行扩增检测。

表 4 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	5min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火，延伸	60℃	35s	
5	变性	94℃	15s	
6	退火，延伸，荧光信号采集(FAM, VIC/HEX)	60℃	35s	35
7	仪器冷却	25℃	1min	

5.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

- 1) 面板设置：在“User Defined Workflow”操作系统，双击“LightCyclerB480 SW UDF 2.0.0”图标打开软件，输入用户名和密码登录后进入软件主界面，点击“New Experiment”进入程序设定界面。点击“Experiment”，在“Detection Format”下拉菜单选择“Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”。点击“Sample Editor”，在 Step1 中选择“Abs Quant”(绝对定量)；在 Step2 中选择对应的样本反应孔，在右侧编辑栏中分别对每个反应孔进行编辑：在“Sample Name”编辑样本名称，“Quantification Sample Type”选择样本类型“Unknown”(待测样本)、“Positive Control/Calibrator”(阳性对照)、“Negative Control”(阴性对照)、“Standard”(标准品)；在 Step3 中，对“Sample Type”为“Standard”的样本，在“Concentration”输入标准品浓度。
- 2) 反应条件设置：点击“Experiment”，在“Reaction Volume”输入反应体系大小。按照所需 PCR 反应条件进行编辑(见表 3)：在“Program Name”添加反应步骤，并选择“Cycles”(循环数)和“Analysis Mode”；单击每个“Program”对各步骤的反应温度及时间进行编辑。在荧光信号采集阶段，Analysis Mode 下拉菜单中选择 Quantification, Acquisition Mode 下拉菜单中选择 Single。设置完成后，单击“Start Run”选择保存位置并编辑文件名称，即可进行扩增检测。

表 5 PCR 扩增程序

序号	阶段	温度	时间	循环数
1	UDG 酶反应	37℃	2min	1
2	预变性	95℃	5min	1
3	变性	94℃	15s	10
4	退火，延伸	60℃	35s	
5	变性	94℃	15s	
6	退火，延伸，荧光信号采集(FAM, VIC/HEX)	60℃	35s	35
7	仪器冷却	37℃	1min	

6. 试验结果的计算或读取

反应结束后，使用 PCR 仪配套软件对本次试验结果进行分析，其基线(噪音线)及阈值线为自动设置。当发生背景信号过高等情况而使得扩增曲线水平部分出现异常时，请手动设置基线；另外，因为不同的基因扩增出的信号大小和指数期的位置会有所不同，当阈值线位置不当而导致结果分析有误时，请手动设置阈值线，以下为手动设置基线及阈值线的方法。

6.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

基线设置：点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的反应孔，取消“Auto Threshold”和“Auto Baseline”选项，设置“Start /End Cycle”为扩增信号出现的前一个循环点击“Analysis”。

阈值线设置：点击 Analysis settings 选择基线设置不正确的基因，取消“Auto Threshold”设置“threshold”数值点击“Analysis”。

6.2 Bio-Rad CFX-96 型荧光定量 PCR 仪

基线设置：在“定量”选项卡的荧光基团选择器中选择一个荧光基团，方法是单击扩增图表下方荧光基团名称旁边的框，选择设置基线阈值以打开“基线阈值”窗口，调整每个反应孔的开始和结束基线循环，在“基线循环”窗格中，通过单击行号选择一个或多个反应孔，单击左上角可选择全部反应孔，按住 Ctrl 键可选择多个单独的反应孔，而按住 Shift 键则可选择多个连续的反应孔，为所有选定的反应孔调整基线起点循环和基线终点循环，或在电子表格底部更改开始和结束循环数，单击确定。

阈值设置：单击扩增图表中的阈值线，然后垂直移动鼠标指针即可。

6.3 罗氏 Cobas z480 型荧光定量 PCR 仪

基线设置：点击 Analysis，在 create new analysis 中选择 Abs Quant/Fit (Points，在弹出框中点击)，选择 Noise Band 窗口，在 Noiseband (Auto)

下拉菜单中选择 noiseband (Fluoresc) 选项，单击扩增图表中的噪音线(基线)，然后垂直移动鼠标指针即可。

阈值设置：在 Noise Band 窗口，选择 Analysis 窗口，单击 Threshold (Auto)，然后垂直移动鼠标指针即可调整阈值线。

7. 质量控制

7.1 内标：HEX/VIC 通道应出现 S 型曲线，Ct 值<30，高 BK 病毒载量样本扩增有可能抑制内标扩增，属正常现象。

7.2 阴性质控品：FAM 通道无 S 型曲线，或在报告界面无 Ct 值显示。

7.3 临界阳性质控品：FAM 通道有 S 型曲线，且测定范围 500～5×10⁴copies/mL，CT≤30。

7.4 阳性质控品：FAM 通道有 S 型曲线，且测定范围 5×10⁴～5×10⁶copies/mL，CT≤23。

7.5 定量标准品 I～IV：用于绘制标准曲线，FAM 通道有 S 型曲线。标准曲线的相关系数 |R| (|r|) ≥0.99，或 R² (r²) ≥0.98。

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。

【参考区间】

通过对临床样本的分析，测定值在 2×10³ copies/mL～5×10⁸ copies/mL 之间的样本，可以准确定量，可直接报告数值；测定值>5×10⁸ copies/mL 的样本，建议将样本用无菌生理盐水稀释至线性范围后重新测定，并根据下面公式计算样本 BK 病毒载量，结果注明为可报告数值。

可报告数值(最终样本 BK 病毒载量)=稀释后 BK 病毒载量×稀释倍数
稀释倍数=(样本量+稀释液量)/样本量
测定值在 1×10³～2×10³ copies/mL 之间的样本，低于本试剂盒线性范围，直接报告数值，并注明“供参考”；测定值在 0～1×10³ copies/mL 的样本(或 CT>32)报告为“低于试剂盒最低检测限(1×10³ copies/mL)”。

【检验结果的解释】

1. 如果内标通道无 S 型曲线，检测结果无效，应重新检测。高 BK 病毒载量样本，由于竞争抑制，内标通道无 S 型曲线属于正常情况。
2. 如果内标通道有 S 型曲线，同时 FAM 通道检测无 S 型曲线，则检测报告为“低于试剂盒最低检测限(1×10³ copies/mL)”。
3. 如果内标通道有 S 型曲线，同时 FAM 通道检测有 S 型曲线，则有如下解释：

3.1 如果待检样本测定值<1×10³ copies/mL(或 CT>32)，则报告为“低于试剂盒最低检测限(1×10³ copies/mL)”。

3.2 测定值在 1×10³ copies/mL～2×10³ copies/mL 之间的样本，直接报告数值，并注明“供参考”。

3.3 测定值在 2×10³ copies/mL～5×10⁸ copies/mL 之间的样本，直接报告所测定的数值。

3.4 测定值>5×10⁸ copies/mL 的样本，则报告为“高于 5.0×10⁸ copies/mL”，如果需要精确定量结果，可将样本用无菌生理盐水稀释至线性范围后重新测定，并根据下面公式计算样本 BK 病毒载量，结果注明为可报告数值。

可报告数值(最终样本 BK 病毒载量)=稀释后 BK 病毒载量×稀释倍数
稀释倍数=(样本量+稀释液量)/样本量

【检验方法的局限性】

1. 本检测结果仅供临床参考。
2. 当样本中 BK 病毒载量低于试剂盒的最低检测限时，可能无法准确检出。
3. 扩增产物的污染和核酸提取中标本间的交叉污染，会导致假阳性结果。因此，PCR 临床实验室需要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。
4. 不合理的样本采集、转运及处理有可能影响实验结果。
5. BK 病毒检测靶序列的变异会导致假阴性结果。
6. 请严格按照本说明书要求进行试剂操作及存储，错误的操作及试剂盒储存条件的改变均可能导致结果的不准确。

【产品性能指标】

1. 最低检测限：根据产品分析性能评估结果，本试剂盒的最低检测限为 1×10³ copies/mL。
2. 分析特异性：
- 2.1 对于可能存在检测干扰的病原体：JC 病毒、人类乳头瘤病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、沙眼衣原体、解脲脲原体、单纯疱疹病毒 I、单纯疱疹病毒 II 和淋球菌，本试剂盒检测结果均为阴性。

2.2 干扰物质：高浓度的尿素(≤40mg/dL)、高浓度的蛋白(≤10mg/mL)、高浓度的胆红素(≤15mg/dL)、高浓度的肌酸酐(≤5mg/dL)、高浓度的葡萄糖(≤120mg/dL)、高浓度的环孢素(≤1237.5mg/L)、高浓度的硫唑嘌呤(≤562.5mg/L)和高浓度的醋酸泼尼松片(≤90mg/L)对 PCR 结果无明显干扰。

3. 精密度：同一批试剂对高低浓度的 2 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≤5%。

4. 线性检测范围：2×10³ copies/mL～5×10⁸ copies/mL。

5. 临床试验：根据临床样本检测结果试验数据的统计分析可知，考核试剂的检测结果准确可靠，与对照试剂相比较有很好的一致性和相关性。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断。
2. 本试剂盒中的阴性质控品为生理盐水，临界阳性质控品、阳性质控品和定量标准品均为灭活的样本，均无传染性，但操作时应仍视为传染性物质进行处理。
3. 开始检测前请仔细阅读本说明书，操作人员应经过专业培训，具有合格的操作技能，并严格按照说明书要求进行操作。
4. 样本操作和处理、实验后的废弃物，如吸头、扩增产物的处理需符合相关法规要求：卫生部《微生物和生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》等。
5. 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。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)，各区的仪器、耗材、试剂等独立专用，不得交叉使用，各区间人员流动及空气流动应有严格要求，最大限度避免交叉污染。
6. 为了保护操作者和避免环境污染，样本处理应在生物安全柜内进行。
7. 实验用的消耗品(如离心管、吸头等)应保证无核酸酶及其他污染。
8. PCR 仪应定期校准及维护，以保证实验结果的可靠性。

【参考文献】

- [1] M. Pakfetrat, R. Yaghoobi, Z. Salmanpoor. Frequency of Polyomavirus BK Infection in Kidney Transplant Patients Suspected to Nephropathy [J]. International Journal of Organ Transplantation Medicine. 2015;6(2):77-84.
- [2] 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]. J Med Virol. 2010 Jul; 82(7):1236-40.
- [3] Seif I, Khoury G, Dhar R. The genome of human papovavirus BKV [J]. Cell. 1979 Dec;18(4):963-77.
- [4]石炳毅,范宇.中国实体器官移植受者 BK 病毒感染临床诊疗指南(2016 版)[J].中华移植杂志(电子版),2017,11(02):65-69.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京旌淮医疗科技有限公司
住 所：北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层
联系方式：电话号码：010-56380023
传真号码：010-56380029
售后服务单位名称：北京旌淮医疗科技有限公司
联系方式：电话号码：010-56380023
传真号码：010-56380029
生产地址：北京市北京经济技术开发区经海四路 156 号院 14 号楼 4 层、11 号楼 4 层
生产许可证编号：京食药监械生产许 202000028 号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】
国械注准 20193400982
【说明书核准日期及修改日期】
2019 年 12 月 09 日