

【产品名称】

通用名称：单纯疱疹病毒(HSV)II 型核酸检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

32 测试/盒、96 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测男性泌尿道拭子和女性宫颈拭子样本中的单纯疱疹病毒(HSV)II 型核酸。

单纯疱疹属于疱疹病毒科 α 病毒亚科，病毒质粒大小约 180 纳米。HSV 基因组大约 152kb，34 个基因，编码 70 多个多肽。HSV II 主要引起腰以下生殖器感染，通过性接触传播。单纯疱疹病毒 II 型的实验室检测有：1)细胞学检查；2)血清学检测；3)抗体及抗原检测；4)核酸检测。本公司开发的试剂盒适用于单纯疱疹病毒(HSV)II 型的辅助诊断，本试剂检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒选用 HSV II 型保守基因片段设计特异性引物及特异性 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 HSV II 型核酸的自动化检测。

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，与单纯疱疹病毒(HSV)II 型目标基因无干扰，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，不会互相干扰，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	主要成分	32 测试/盒	96 测试/盒
核酸提取液	Tris、EDTA、NaCl、NaOH、NP-40、Triton-100、Chelex-100、内标模板	1.8mL×1	4.8mL×1
单纯疱疹病毒 II 型反应混合液	Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dTTP、dATP、dGTP、dCTP、引物、荧光探针	1.2mL×1	3.4mL×1
Taq 酶	Taq DNA 酶及抗体	28μL×1	76.8μL×1
单纯疱疹病毒 II 型阳性对照	HSV II 基因组 DNA(重组克隆)	100μL×1	300μL×1
阴性对照	主要成分为 NaCl	100μL×1	300μL×1

注：本试剂盒采用煮沸法提取核酸，不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

【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 实时荧光定量 PCR 仪、TL988-IV 实时荧光定量 PCR 仪、Gentier96E 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier96R 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier48E 全自动 PCR 分析系统。

【样本要求】

- 标本：男性泌尿道拭子和女性宫颈拭子样本。
- 采集容器：应当选用国家批准生产的一次性使用的男性拭子或女性拭子，拭子应当包括套管、棉签杆、塞子，棉签杆与塞子都应连接牢固。
- 采集：样本采集具体方法请参考《微生物标本采集手册》一书。
【男性】先清洁尿道口，要求病人在采样前 2 小时不能排尿。取尿道分泌物或细小棉拭子伸入尿道约 2~4cm，略捻拭子取出分泌物（应略带黏膜）。将分泌物或棉拭子置入无菌玻璃管，密闭送检。
【女性】先用棉/麻拭子将宫颈口过多的分泌物擦去，用扩阴器扩阴，再换取棉拭子伸入宫颈，通过上皮交界处，直到看不到拭子头，旋转 10~20 秒，取出拭子，将拭子置入无菌玻璃管中，密闭送检。
- 存放：2~8℃保存，不超过 24 小时；-20℃±5℃下保存，不超过 3 个月；-70℃下长期保存，但应避免反复冻融。
- 运输：采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

- 样本处理【样本处理区】
 1.1 标本试管中加入 1mL 无菌生理盐水(冻存标本使用前在室温融解并充分混匀)，充分震荡摇匀，吸取液体转至 1.5mL 离心管中，12000rpm 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 10 秒，100℃水浴或干浴 10 分钟，12000rpm 离心 10 分钟，上清供 PCR 扩增用(如样本裂解产物当天不使用，请于 -20℃±5℃保存)。
 1.2 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 5 分钟。12000rpm 离心 5 分钟，备用。
- 试剂配制【试剂准备区】
 从检测试剂盒中取出单纯疱疹病毒 II 型反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒。计算所需反应试剂测试数 $n[n = \text{样本数} + \text{对照数}(2)]$ ，每测试反应体系配制如下：

试剂	单纯疱疹病毒 II 型反应混合液	Taq 酶	总体积
用量	35.2μL	0.8μL	36μL

按 n 测试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】

单个反应总体积为 40μL，因此往上述分装有 36μL 反应液的 PCR 薄壁管中按顺序分别加入 4μL 单纯疱疹病毒 II 型阳性对照品、4μL 阴性对照品、4μL 样品处理上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 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)

【阳性判断值】

单纯疱疹病毒 II 型阳性判断：FAM 通道检测 Ct 值小于或等于 38.0 时，则判断该样本为单纯疱疹病毒 II 型阳性。

【检验结果的解释】

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。阳性对照 Ct 值应小于 38，阴性对照 Ct 无数值且内标 Ct 值 <40；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。

1. 检测样本 FAM 通道的 Ct 值 ≤38.0 者判为阳性。
2. 检测样本 FAM 通道的 38.0 < Ct ≤40 的样本建议重做，重做结果 Ct 值 <40 者为阳性，否则为阴性。
3. 如果检测样本 FAM 通道的 Ct 值无数据，需要查看内标 Ct 值，如果内标 VIC 通道的 Ct 值 <40 的标本为阴性标本，内标 Ct 值无数据则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

【检验方法的局限性】

1. 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。
2. 实验区域污染、气溶胶污染有可能造成假阳性结果。
3. 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。
4. 样本中的被检物浓度低于检测限时，有可能造成假阴性的结果。
5. 本试剂盒适用于 ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪、TL988-IV 实时荧光定量 PCR 仪、Gentier96E 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier96R 全自动医用 PCR 分析系统、Gentier48E 全自动 PCR 分析系统五种荧光定量检测系统对单纯疱疹病毒核酸的检测，其他仪器尚无可靠实验数据，请谨慎使用。

【产品性能指标】

1. 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。
2. 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。
3. 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。
4. 检测限：浓度为 500copies/mL 的检测限参考品 L，重复 20 次，至少 17 次检测结果为阳性，检测结果符合率应 ≥17/20。
5. 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，检测 Ct 值的变异系数(CV,%) ≤5%。
6. 本试剂盒与单纯疱疹病毒 I 型(HSV I 型)、沙眼衣原体(CT)、解脲支原体(UU)、淋球菌(NG)、人乳头状瘤病毒 16 型(HPV16 型)、人乳头状瘤病毒 18 型(HPV18 型)样本无交叉反应。

【注意事项】

1. 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。
2. 本试剂盒仅用于体外检测。
3. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
4. 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。
5. 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。
6. 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。
7. 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。
8. 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。
9. 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。
10. 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。
11. 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。
12. PCR 反应混合液应避光低温保存。
13. 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】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
5. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026-1030.
6. 穆士杰,苏明权,祝道成,等.聚合酶链反应检测单纯疱疹病毒方法的建立.中华流行病学杂志,1992;13(特刊 2 号):100.
7. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.
8. Loens K,Ieven M,Ursi D,et al.Detection of Mycoplasma pneumoniae by realtime nucleic acid sequence based a HSV II lification [J].J Clin Microbiol,2003,41(9) : 4448- 4450.

【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 20153402133

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2020.07.22

修改日期：2021.03.12