

单纯疱疹病毒 I、II 分型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【产品名称】

通用名称：单纯疱疹病毒 I、II 分型核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 25 人份 / 盒、50 人份 / 盒

【预期用途】 本试剂盒用于对男性尿道分泌物及女性宫颈分泌物样本中单纯疱疹病毒（Human simplex virus,HSV）I 型和 II 型特异性 DNA 核酸片段同时进行分型荧光 PCR 的定性检测。

本试剂盒可作为单纯疱疹病毒感染的辅助诊断。本试剂盒的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。单纯疱疹病毒（Herpes simplex virus,HSV）是一种嗜神经性的双链 DNA 包膜病毒，人是其唯一的自然宿主，人群感染高达 80-90%，10%无症状。HSV I 型主要引发躯体腰以上部位皮肤粘膜和中枢神经系统的感染，一般通过口腔及污染的手及飞沫感染，感染多见于儿童，常引起口腔牙龈和口腔炎，多为隐性感染，并不表现出症状。HSV II 型侵及躯体腰以下部位，多通过性活动传播，主要是生殖器部位皮肤粘膜及新生儿感染，引起生殖器疱疹，幼儿多见眼口炎，儿童多见疱疹唇炎及角膜炎，而生殖器疱疹则青壮年为多。HSV I 型和 HSV II 型在人群中的血清流行率分别为 68% 和 22%。HSV I 型是世界上流行最广的病毒性感染之一，成年人血清中阳性率高达 85%以上，某些国家和地区甚至达到 100%。据有关统计资料显示，生殖器疱疹的病原体 90%为 HSV II 型，仅 10%为 HSV I 型。据估计全世界有 20%人为 HSV II 型阳性，并且发病人数以约 25%的比例逐年增加。

【检验原理】 本试剂盒应用聚合酶链式反应（PCR）结合 Taqman 技术，采用 HSV 特异性引物探针，分别对单纯疱疹病毒（HSV）I 型和 II 型的特异性 DNA 核酸片段进行荧光 PCR 分型检测。

【主要组成成分】

序号	组分	包装规格		体积 / 人份	主要成分
		25 人份	50 人份		
1	核酸抽提液	1.4mL×1	1.4mL×2	50μL	氯化钠、EDTA-Na ₂
2	单纯疱疹病毒 I、II 分型核酸荧光 PCR 检测混合液	972μL×1	936μL×2	36μL	1 对引物、3 条荧光探针及 PCR Mix
3	酶（Taq+UNG）	10.8μL×1	20.8μL×1	0.4μL	Taq DNA 聚合酶、UNG 酶
4	单纯疱疹病毒 I、II 阴性对照品	50μL×1	50μL×1		灭活人阴性血清
5	单纯疱疹病毒 I、II 阳性对照品	50μL×1	50μL×1		含目的基因片段的缺陷性病毒
6	单纯疱疹病毒 I、II 内标	30μL×1	60μL×1		含目的基因相似片段的缺陷性病毒

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

【储存条件和有效期】 试剂盒应在-20±5℃避光保存，有效期 12 个月。

采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封进行运输；荧光 PCR 检测混合液反复冻融不宜超过 3 次。生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】 本试剂盒适用于 ABI Prism 7500 实时荧光 PCR 仪；Bio-Rad CFX96 实时荧光 PCR 仪；上海宏石 Slan 荧光 PCR 检测系统。

【样本要求】

1. 男性尿道分泌物：清洗尿道口，用灭菌纱布或棉球擦拭，采取从尿道口溢出的脓性分泌物或用无菌男性拭子伸入尿道约 2~4 厘米，轻轻旋转后取出分泌物（应略带黏膜）。将分泌物或拭子置于无菌样本采集管中，密闭送检。
2. 女性宫颈分泌物：用窥器扩张阴道，先用无菌拭子清除阴道和宫颈外分泌物，弃拭子；轻压宫颈使宫颈内分泌物流出，用女性拭子插入宫颈管 1~2 厘米处采取分泌物，转动并停留 10~30 秒，让拭子充分吸附分泌物，将拭子置于无菌样本采集管中，密闭送检。上述样本可在 2℃~8℃放置 7 天，长期保存应置于≤-20℃条件下，避免反复冻融。

【检验方法】

1. 样本、对照品的核酸裂解处理

冻存样本和对照品请在室温融解，充分混匀后使用。

核酸抽提液*配制：取 N×50μL 核酸抽提液与 N×1μL 内标混匀，N=样本数。

(1) 男性尿道分泌物\女性宫颈分泌物：样本采集管中加入 1mL 无菌生理盐水，充分震荡摇匀，吸取液体转至 1.5mL 离心管中（如分泌物较多，只取 0.2mL），13,000rpm 离心 5 分钟。沉淀加无菌生理盐水 1mL 混匀，13,000rpm 离心 5 分钟，再重复洗涤一次。沉淀直接加入 50μL 核酸抽提液*充分混匀，99℃干浴或水浴 10 分钟，然后 13,000rpm 离心 10 分钟，取上清 4μL 作为 PCR 反应模板。

(2) 对照品：取阳性对照品、阴性对照品各 50μL，分别加入核酸抽提液*50μL 充分混匀，99℃干浴或水浴 10 分钟，13,000rpm 离心 10 分钟，取上清 4μL 作为 PCR 反应模板。

2. 试剂配制 取 n×36μL HSV 分型核酸荧光 PCR 检测混合液与 n×0.4μL 酶（Taq+UNG）（n 为反应管数），振荡混匀数秒，3000rpm 离心数秒。

3. 加样 取上述混合液 36μL 置于 PCR 管中，然后将样本、阳性对照品、阴性对照品处理上清液各 4μL 分别加入 PCR 管中，盖好管盖，立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增 反应管置于荧光 PCR 仪上，推荐循环参数设置：

37℃×2min；94℃×2min；再按 93℃×15sec→60℃×60sec，循环 40 次；单点荧光检测在 60℃。反应体系为 40μL。

荧光通道检测选择如下：

机型\通道	1	2	3
ABI7500	FAM	VIC	TEXAS RED
CFX96	FAM	VIC	Cal Red 610
SLAN	通道 1	通道 2	通道 3

备注：如使用 ABI Prism7500 实时荧光 PCR 仪，请务必于 passive reference 和 quencher 处均选择“none”。

5. 基线和阈值设定 基线调整取 6-15 个循环的荧光信号，阈值设定原则以阈值线刚好超过阴性对照品检测荧光曲线的最高点。

6. 质量控制 阴性对照品检测结果应为：FAM 通道 和 VIC 通道 Ct 栏显示 Undetermined(ABI7500)或 N/A(CFX96)或 No Ct(SLAN)，610 通道 Ct 值≤38（且有明显 S 型扩增曲线）；阳性对照品检测结果应为：FAM 通道和 VIC 通道 Ct 值均≤35，且有明显 S 型扩增曲线，否则实验视为无效。

7. 试验结果的判断

FAM 通道	VIC 通道	610 通道	结果判断
--------	--------	--------	------

1	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤38,且有明显 S 型扩增曲线	HSV I、II 型阴性
2	Ct 值≤38,且有明显 S 型扩增曲线	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	—— (见注 1)	HSV I 型阳性
3	Undetermined 或 N/A 或 No Ct	Ct 值≤38,且有明显 S 型扩增曲线	—— (见注 1)	HSV II 型阳性
4	Ct 值≤38,且有明显 S 型扩增曲线	Ct 值≤38,且有明显 S 型扩增曲线	—— (见注 1)	HSV I、II 型阳性

待检样本 Ct 值在 38~40 之间,需重复测定,如仍在 38~40 之间,则判为低于检测限,报告为阴性。

注 1: 对于 FAM 通道或 VIC 通道具有明显 S 型扩增曲线 (Ct≤38) 的样本,其 610 通道扩增结果可能有明显 S 型扩增曲线 (Ct≤38),也可能因为高浓度的目的基因竞争性抑制而导致无 S 型扩增曲线或 No Ct。

【阳性判断值】根据临床试验数据绘制 ROC 曲线,确定本试剂盒的参考值 (阳性判断值) 为 Ct=38。

【检验结果的解释】实验室环境污染,试剂污染,样本交叉污染会出现假阳性结果;试剂运输,保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降,出现假阴性的结果。当样本在 FAM、VIC 及 610 通道均显示为 Undetermined 时,则表明 PCR 反应受到抑制或提取不当,需重复试验。

【检验方法的局限性】① 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、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。② 阴性结果仅说明样本浓度低于本试剂盒的检出限值但不能完全排除感染的可能,阳性结果建议采用金标准方法进一步确认。③ 有关假阴性结果的可能性分析:当检测样本中被检核酸浓度含量低于最低检测限时可能会发生假阴性的结果;不合理的样本采集、转运及处理有可能会发生假阴性结果;未经验证的其他干扰或 PCR 抑制因子可能会导致假阴性结果;试剂运输,保存不当或试剂配制不准确引起的试剂检测效能下降,出现假阴性的结果。④ 有关假阳性结果的可能性分析:实验室环境污染,试剂污染,样本交叉污染会出现假阳性结果。

【产品性能指标】

- 最低检测限: 1×10^3 copies/mL;
- 分析特异性: 经验证本试剂盒与淋球菌、解脲支原体、沙眼衣原体、人乳头瘤病毒 6 型、人乳头瘤病毒 11 型、弓形虫、人型支原体、鼻咽癌病毒、人疱疹病毒 6 型、人疱疹病毒 8 型均不会发生交叉。
- 企业阳性参考品: 用 HSV I 型阳性参考品 HSV-I P1~HSV-I P5 进行检测,检测结果应均为 HSV I 型阳性且 HSV II 型阴性 (符合率 5/5)。用 HSV II 型阳性参考品 HSV-II P1~HSV-II P5 进行检测,检测结果应均为 HSV II 型阳性且 HSV I 型阴性 (符合率 5/5)。
- 企业阴性参考品: 用阴性参考品 N1~N7 进行检测,检测结果应为 HSV I 型和 II 型均为阴性 (阴性符合率 7/7)。
- 企业最低检出限参考品: HSV I 型最低检出限参考品 HSV I-S1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释,检测结果均应为 HSV I 型阳性。HSV II 型最低检出限参考品 HSV II-S1 经 1:10、1:100、1:1000、1:10000 倍稀释,检测结果均应为 HSV II 型阳性。
- 精密度: 用高、低两个浓度的 HSV I 型精密度参考品进行检测 (n=10),检测结果 Ct 值的变异系数 (CV,%) 均 <5%。用高、低两个浓度的 HSV II 型精密度参考品进行检测 (n=10),检测结果 Ct 值的变异系数 (CV,%) 均 <5%。
- 干扰物质研究: 常用药物,如阿昔洛韦 ($\leq 1.2\text{mg/L}$)、四环素 ($\leq 5\text{mg/L}$)、阿奇霉素 ($\leq 0.4\text{mg/L}$)、更昔洛韦 ($\leq 9\text{mg/L}$)、地塞米松 ($\leq 2.5\text{mg/L}$)、磺胺嘧啶 ($\leq 60\text{mg/L}$)、螺旋霉素 ($\leq 1\text{mg/L}$)、罗红霉素 ($\leq 7.9\text{mg/L}$)、米诺环素 ($\leq 7\text{mg/L}$)、氯化可的松 ($\leq 25\text{mg/L}$) 均不会干扰本试剂盒检测。

【注意事项】本产品仅用于体外诊断,其中阴性对照品含有人源性材料,应视为传染源对待,需在生物安全柜内操作,并符合相关法规要求。

开始检测前请仔细阅读本说明书全文。

- 整个检测过程应严格分在三区进行: PCR 反应体系的配制区;样本处理、加样区;PCR 扩增、荧光检测及结果分析区。各区使用的仪器、设备、耗材和工作服应独立专用。实验后即请清洁工作台,并进行消毒。
- 使用不含荧光物质的一次性手套 (经常替换)、一次性专用离心管、自卸式移液器和带滤嘴吸头。
- 试剂准备和样本处理应使用超净工作台 (负压式) 或防污染罩,以防止对环境污染。
- 每次实验应设置阴、阳性对照品。
- 操作人员应经过专业培训,具有一定经验和操作技能。
- 操作台、移液器、离心机、PCR 扩增仪等仪器设备应经常用 10% 次氯酸或 75% 酒精、紫外线灯或臭氧消毒处理。
- 实验中接触过标准品和对照品的废弃物品 (如吸头)、扩增完毕的离心管、样本等应进行无害化处理后方可丢弃。
- 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
- PCR 反应混合液应避光保存。
- 反应管中尽量避免气泡存在,管盖需盖紧,反应结束后严禁打开 PCR 反应管。
- 不同批号的试剂请勿混用,请在有效期内使用试剂盒。

【参考文献】

- [1] Lilly Namvar, Sigvard Olofsson, Tomas Bergström, and Magnus Lindh Detection and Typing of Herpes Simplex Virus (HSV) in Mucocutaneous Samples by TaqMan PCR Targeting a gB Segment Homologous for HSV Types 1 and 2 J. Clin. Microbiol., May 2005; 43: 2058 - 2064.
- [2] Jérôme Legoff, Hicham Bouhlal, Gérard Grésenguet, Helen Weiss, Nzambi Khonde, Hakim Hocini, Nathalie Real-Time PCR Quantification of Genital Shedding of Herpes Simplex Virus (HSV) and Human Immunodeficiency Virus (HIV) in Women Coinfected with HSV and HIV J. Clin. Microbiol., Feb 2006; 44: 423 - 432.
- [3] L. Batellier, P. Goldschmidt, S. Degorge, M.-L. Sullam-Rea, and C. Chaumeil Diagnosis of Herpes-Associated Uveitis (HSV, VZV, CMV) By Real-Time PCR And Local Secretion of Specific Antibodies in Aqueous Humor Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., May 2006; 47: 3063.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 上海之江生物科技股份有限公司

住所: 上海市张江高科技产业东区瑞庆路528号20幢乙号1层、21幢甲号1层

联系方式: 021-34680028 E-mail: river@liferiver.com.cn

售后服务单位名称: 上海之江生物科技股份有限公司

联系方式: 021-34680028 E-mail: service@liferiver.com.cn

生产地址1: 上海市张江高科技产业东区瑞庆路528号20幢乙号1层、21幢甲号1层

生产地址2: 上海市漕河泾开发区浦江高科技园区新骏环路 588 号 26 号楼

医疗器械生产企业许可证编号: 沪食药监械生产许20081591号

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20183401702

【说明书批准及修改日期】2018-5-12