



单纯疱疹病毒II型 (HSV-II) 核酸检测试剂盒 (荧光PCR法) 说明书

【产品名称】

通用名称: 单纯疱疹病毒II型 (HSV-II) 核酸检测试剂盒 (荧光PCR法)

【包装规格】

24人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用体外定性检测疱疹溃疡部位刮片、生殖泌尿道分泌物样本中的单纯疱疹病毒II型 (HSV-II) 的核酸。

人类单纯疱疹病毒分为两型, 即单纯疱疹病毒I型 (HSV-I) 和单纯疱疹病毒II型 (HSV-II)。单纯疱疹病毒II型在病毒分类学上归于人疱疹病毒科α亚科, 单纯疱疹病毒属, 病毒呈球形, 为DNA病毒。其又称生殖器疱疹, 多感染腰以下部位, 主要为生殖器感染。单纯疱疹病毒感染在全球人群中十分普遍, 人类是唯一的宿主, 感染主要通过人群与易感者之间的密切接触。可引起疱疹性皮肤炎、生殖器疱疹, 亦可引起胎儿宫内感染, 诱发胎儿流产、早产、死胎和畸形, 又可以感染新生儿。HSV-I型与HSV-II型容易发生交叉性感染。

【检验原理】

本试剂盒采用聚合酶链式反应(PCR)及荧光标记探针技术, 快速检测临床样品中单纯疱疹病毒II型特有序列, 从而判断单纯疱疹病毒II型的存在。

【主要组成成分】

编号	组成成分	规格和数量	主要成分
1	DNA提取液	1200μL/管×1管	分子生物纯树脂(chelex 100)、三羟甲基氨基甲烷盐酸液(Tris HCl)、氢氧化钠(NaOH)、聚乙二醇辛基苯基醚(Triton-100)、裂解液(NP-40)、乙二胺四乙酸(EDTA)
2	单纯疱疹病毒II型-PCR反应液	1056μL/管×1管	缓冲液(Buffer)、探针、引物、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、氯化镁(MgCl ₂)
3	DNA聚合酶系	24μL/管×1管	Taq DNA聚合酶、尿嘧啶-N-糖基化酶(UNG酶)
4	阳性质控品	200μL×1管	含有目的基因的质粒
5	弱阳性质控品	200μL×1管	含有目的基因的质粒
6	阴性质控品	200μL×1管	三羟甲基氨基甲烷盐酸液(Tris HCl)、乙二胺四乙酸(EDTA)

注: 阳性质控品为含目的基因的质粒, 目的基因来自美国菌种保藏中心(ATCC)的原始菌株。

【储存条件及有效期】

储存条件: -20℃保存, 有效期6个月; 开封后置于4℃保存, 请于一周内使用, 避免反复冻融(冻融次数少于5次)。生产日期和有效期见产品标签。

运输条件: 低温运输, 长途运输应使用冰袋。

【适用仪器】

ABI 7500、STRATAGENE Mx3000P荧光PCR仪。

【样本要求】

1. 适用标本类型: 疱疹溃疡部位刮片、生殖泌尿道分泌物拭子。

2. 标本采集:

2.1 疱疹溃疡部位刮片: 用刮片刮取溃疡病灶处的脱落细胞, 置入无菌玻璃管, 密闭送检。

2.2 男性尿道样本: 用无菌拭子插入尿道约2cm处旋转, 静止数秒钟后取得分泌物标本, 放回管中密闭送检。

2.3 女性尿道样本: 先用无菌生理盐水清洗尿道口, 再用无菌拭子插入尿道约2cm处旋转取得分泌物标本, 放回管中密闭送检。

2.4 女性生殖道样本: 先用无菌生理盐水擦去阴道内过多的分泌物, 再将无菌拭子放于生殖道低位1/3处轻轻旋转取得黏膜分泌物标本, 放回管中密闭送检。

3. 标本保存和送检: 标本可立刻送检, 在4-25℃保存不应超过6天, 非液体性标本也可在-20℃保存6个月。标本长途送检时应使用冰袋。

注: 样本采集前24小时内禁止使用外用药物(药膏、喷剂、栓剂、洗液等)。

【检验方法】(使用前请仔细阅读本操作流程)

一、试剂准备(试剂准备区)

1. 取出DNA提取液, 备用。

2. 确定需要进行的反应管数n(标本数+阴性+强阳性质控品+弱阳性质控品)后, 取出HSV-II-PCR反应液, 将n×44μL HSV-II-PCR反应液, n×1μL DNA聚合酶系加入一个离心管中并震荡混匀, 瞬时离心后, 向每一个PCR反应管中分装45μL, 盖管盖后转移到加样区, 避光放4℃冰箱备用。

3. 将对照品转移到样品处理区, 放于4℃冰箱中备用。

二、样本处理(样本处理区)

1. 待测样本处理:

1.1 生殖泌尿道分泌物拭子

1.1.1 向拭子管中加入1mL灭菌生理盐水, 高速震荡1分钟, 挤干拭子;

1.1.2 将1.1.1处理后的全部液体转移到1.5mL离心管中(如分泌物过多, 只取200μL), 10 000rpm离心5分钟;

1.1.3 去上清, 向沉淀中加入1mL灭菌生理盐水, 充分混匀, 10 000rpm离心5分钟;

1.1.4 去上清, 向沉淀中加入50μLDNA提取液, 充分混匀, 100℃恒温处理10分钟;

1.1.5 10 000rpm离心5分钟, 上清液用于PCR反应。

1.2 尿道口或患病部位刮片部位刮片

1.2.1 向玻璃管中加入1mL灭菌生理盐水, 充分振荡, 尽可能将细胞洗脱;

1.2.2 将1.2.1处理后的全部液体转移到1.5mL离心管中, 10 000rpm离心5分钟;

1.2.3 去上清, 向沉淀中加入1mL灭菌生理盐水, 充分混匀, 10 000rpm离心5分钟;

1.2.4 去上清, 向沉淀中加入50μLDNA提取液(提取液内含不溶于水的物质, 应充分混匀后吸取), 充分混匀, 100℃恒温处理10分钟;

1.2.5 10 000rpm离心5分钟, 上清液用于PCR反应。

2. 阴性质控品样本处理

2.1 取出阴性质控品, 瞬时离心, 取50μL到1.5mL离心管中, 加入50μLDNA提取液(提取液内含不溶于水的物质, 应充分混匀后吸取), 充分混匀, 100℃恒温处理10分钟;

2.2 13 000rpm离心5分钟, 上清液用于PCR反应。

3. 阳性质控品样本处理: (同阴性质控品)。

4. 弱阳性质控品样本处理: (同阴性质控品)。

三、PCR反应

1. 加样(样品处理区或者加样区)

向准备好的PCR反应液管中分别加入处理好的待测样品、阴性质控品样本、阳性质控品、弱阳性质控品样本, 上清液5μL, 盖紧管盖后瞬时低速离心。

2. PCR扩增(检测区)

将准备好的PCR反应管放置于PCR仪上, 编辑样本信息并按下列循环参数进行扩增反应:。

循环参数:		HSV-II检测荧光素: FAM
Stage 1	37°C----2min;	内参照检测荧光素: HEX (如所使用的仪器没有HEX通道, 请使用JOE通道) 反应体积: 50μL 荧光信号收集: Stage 3: 55°C----45sec; 末端收集
Stage 2	94°C----2min;	
Stage 3	94°C----15sec 55°C----45sec	
		40循环

HSV-II-PCR反应体系包括: HSV-II检测和内参照。

【阳性判断值】

利用仪器配套软件进行自动分析, 得到各样品Ct 值

1	HSV-II (HSV-II-FAM) Ct 值≤36, 且有较好的对数增长曲线	HSV-II阳性结果	
2	HSV-II (HSV-II-FAM) Ct 值=40 或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500), 内参 (HEX) Ct 值<30, 且有较好的对数增长曲线。	HSV-II阴性结果 (HSV-II的DNA含量低于检测下限)	
3	36 < Ct 值 < 40	灰区, 应重复检测2次	重复检测2次, Ct 值=40, 阴性结果 重复检测2次, 至少1次Ct 值<30 且有较好的对数增长曲线, 判定为疑似阳性结果, 建议临床上重新取样检测或采用其它检测手段进行检测。

【结果分析条件设定】

1. ABI 7500 基线 (baseline) 设定: 取2个到样品阈值 (threshold) 前3个循环值作为基线。阈值 (threshold) 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性质控品扩增曲线 (无规则的噪音线) 的最高点, 即Ct值=40 或者 “Undet.” 为准。
2. STRATAGENE Mx3000P 基线设定: 选择 “适合基线 (Adaptive baseline)” 设定时的荧光信号。阈值 (threshold) 设定原则以阈值线刚好超过正常阴性质控品扩增曲线 (无规则的噪音线) 的最高点, 即Ct值=40 或者 “No Ct” 为准。

【质控标准】

本试剂盒阴、阳性质控品应同时满足以下条件, 否则视为本次实验无效:

1. 阴性质控品: HSV-II (FAM) Ct 值= 40 或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500), 内参照 (HEX) Ct 值<40, 且有较好的对数增长曲线。
2. 阳性质控品: HSV-II (FAM) 有较好的对数增长曲线, $18 \leq Ct \leq 24$ 。
3. 弱阳性质控品: HSV-II (FAM) 有较好的对数增长曲线, $27 \leq Ct \leq 33$ 。

【检验结果的解释】

1. HSV-II阴性: HSV-II (HSV-II-FAM) Ct 值=40 或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500); 且内参照 (HEX) 通道Ct值<30, 且有较好的对数增长曲线, 则HSV-II的DNA含量小于检测下限。
2. HSV-II阳性: HSV-II (HSV-II-FAM) Ct 值≤36, 且有较好的对数增长曲线; 内参照 (HEX) Ct 值≤30。
3. 反应无效: HSV-II (HSV-II-FAM) Ct 值=40 或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500); 且内参照 (HEX) Ct 值=40 或 “No Ct” (Mx3000P) 或者 “Undet.” (ABI 7500)。

【检验方法的局限性】

本试剂盒适用于检验临床标本, 但其检测结果也受检测仪器及仪器正确使用的影响。本试剂盒检测结果可供临床参考, 不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【产品性能指标】

1. 本试剂盒检测下限为 5.0×10^2 copies/mL, 线性范围: 5.0×10^8 copies/mL - 5.0×10^2 copies/mL。
2. 本产品经实验证明不会与临床常见其他各类病原体产生交叉反应, 具体见下表:

编号	名称	来源	浓度	干扰结果
1	EB病毒	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
2	水痘带状疱疹病毒	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
3	人巨细胞病毒	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
4	人疱疹病毒6型	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
5	人疱疹病毒5型	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
6	人疱疹病毒8型	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
7	解脲脲原体	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
8	沙眼衣原体	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
9	单纯疱疹病毒 I 型	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
10	表皮葡萄球菌	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
11	生殖器支原体	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
12	人型支原体	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
13	淋球菌	CMCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
14	B族链球菌	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰
15	人乳头瘤病毒	ATCC	10^5 - 10^6 个菌/mL	无干扰

3. 本产品批内差及批间差CV值均小于10%。

4. 在对单纯疱疹病毒II型的临床标本检测中, 本产品与对比试剂 (获得SFDA认证) 的符合率达95%以上, 符合临床使用要求。

5. 在本产品经实验证明正常浓度的人体干扰物质如血液、尿液、粘液及正常使用浓度的外用药物, 制霉菌素、甲硝唑、硝酸咪康唑均不会对实验结果产生影响。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。试剂盒内所有组分均可能存在毒性, 切勿入口。
2. 请在实验前详细阅读说明书, 实验需由有经验或经过培训的实验人员进行操作。
3. 取用PCR反应管需戴无粉乳胶手套或薄膜手套。
4. PCR反应液内有酶及荧光探针, 应避免反复冻融且需避光保存。
5. 试剂盒内各试剂使用前, 需充分融化后进行瞬时离心, 以使管壁上液体离心到管底。
6. 实验过程中使用的离心管和移液器吸头需进行高温高压灭菌。
7. 临床样本的处理需要在生物安全柜中进行。
8. PCR反应管经瞬时离心后, 上机前避免振摇。
9. 吸取模板时, 应避免吸到底部沉淀。
10. 完成加样后建议用石蜡进行封液并尽快盖紧管盖。
11. 扩增完毕后, 待PCR扩增仪中温度降至室温后再将PCR反应管取出, 并装入密闭的塑料袋中, 按医疗废弃物处理。
12. 实验中使用的吸头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废液缸内, 并与其他废弃物一同灭菌消毒。
13. 每次实验前, 生物安全柜需进行紫外灯消毒。实验完成后, 生物安全柜和移液器均需用10%的84消毒液擦拭, 10分钟后再用70%的乙醇擦拭。
14. 不同批号的试剂请勿混用, 请在有效期内使用试剂盒。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 泰普生物科学 (中国) 有限公司

住所: 厦门市同安区西洲路2043号11层

联系方式: 0592-3737666 咨询热线: 400-7032032 网址: www.tibchina.com

售后服务单位: 泰普生物科学 (中国) 有限公司

联系方式: 0592-3737666 咨询热线: 400-7032032 网址: www.tibchina.com

生产地址: 厦门市同安区西洲路2041号101、201、301单元; 2045号101、201、501单元

生产许可证编号: 闽药监械生产许20110184号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20163400889

【说明书核准及修改日期】2016年05月03日批准; 2017年10月27日修改; 2018年03月15日修改; 2020年03月18日修改; 2021年04月20日修改; 2022年06月08日修改。