



单纯疱疹病毒 I 型 (HSV I) 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 I 型 (HSV I) 核酸检测试剂盒 (荧光PCR法)

【包装规格】

24人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于对疱疹溃疡部位刮片、生殖泌尿道分泌物样本中的单纯疱疹病毒 I 型 (HSV I) 进行体外定性核酸检测。

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 I 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。其主要引起生殖器以外的皮肤、粘膜 (口腔粘膜) 和器官 (脑) 的感染。HSV-I 与 HSV-II 容易发生交叉性感染。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。可引起口唇性疱疹、疱疹性角膜炎、疱疹性皮肤炎、阴部疱疹、卡波西病等, HSV-I 感染也是散发性致死性脑膜炎的最常见原因之一。

【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 I 型高度保守的核酸序列 (TFT401), 从而判断单纯疱疹病毒 I 型的存在。

【主要组成成分】

编号	组成成份	规格和数量	主要成分
1	核酸提取液	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 (Tween-100)、裂解液 (NP-40)、乙二胺四乙酸 (EDTA)
2	单纯疱疹病毒 I 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, 密封送检。

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, 放回管中密封送检。

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, 放回管中密封送检。

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, 再将无菌拭子放置于生殖道低位1/3处轻轻旋转取得粘膜分泌物标本, 放回管中密封送检。

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 (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 (标本数 + 阳性 + 强阳性质控品 + 弱阳性质控品) 后, 取出HSV-I PCR反应液, 将n × 44μL HSV-I -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, 盖上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 疱疹溃疡部位刮片

1.1.1 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;

1.1.2 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50μL核酸提取液 (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;

1.1.5 10 000rpm离心5分钟, 上清液用于PCR反应。

1.2 生殖泌尿道分泌物拭子

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

1.2.2 以下操作按照1.1.2、1.1.3、1.1.4、1.1.5进行。

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50μL核酸提取液 (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 瞬时离心, 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:		40循环	HSV-I 检测荧光素: FAM 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℃----45sec; 末端收集
Stage 1	37℃----2min;		
Stage 2	94℃----2min;		
Stage 3	94℃----15sec 55℃----45sec		

HSV- I -PCR反应体系中包含: HSV- I 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- I (HSV- I -FAM)Ct 值 ≤ 36 , 且有较好的对数增长曲线	HSV- I 阳性结果
2	HSV- I (HSV- I -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- I 阴性结果(HSV- I 的DNA含量低于检测下限)
3	36 < Ct 值 < 40	灰区, 应重复检测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_{阴性质控品}=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_{阴性质控品}=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- I (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- I (FAM) 有较好的对数增长曲线。18 $\leq$ Ct 值 ≤ 24 。

3. 弱阳性质控品: HSV- I (FAM) 有较好的对数增长曲线。27 $\leq$ Ct 值 ≤ 33 。

【检验结果的解释】

1. HSV- I 阴性: HSV- I (HSV- I -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- I 的DNA含量小于检测下限。

2. HSV- I 阳性: HSV- I (HSV- I -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- I (HSV- I -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II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I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, 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, 应避免吸到底部的沉淀。

10. 完成加样后建议用石蜡进行封盖并尽快盖紧管盖。

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需10%的84消毒液擦拭, 10min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20163400893

【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01月29日修改; 2022年06月07日修改。