

丙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【产品名称】

通用名称：丙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

32 测试/盒、96 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测人血清或血浆样本中的丙型肝炎病毒核酸（HCV RNA）。

本试剂盒主要通过对丙型肝炎患者血中 HCV RNA 基线水平和变化情况的监测，用于评估抗病毒治疗的应答和治疗效果监测。

本试剂盒检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标，必须结合患者临床表现和其他实验室检测指标对病情进行分析。

本试剂盒不得用于血源筛查。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 TaqMan PCR 技术，在 HCV 基因组高度保守的基因片段上设计特异引物和 TaqMan 探针，通过检测扩增过程中荧光报告基团发出的荧光强度，实时监测 PCR 产物的数量。

本试剂盒采用内标法定量，将一定量的内标加入至每个样本管中，与样本中的靶标核酸一同提取、扩增。由于各管中初始加入的内标量是相同的，可以通过内标 Ct 值的变化反映管间核酸提取及扩增的差异，从而对靶标的初始浓度定值进行补偿，通过内标与目标基因扩增的 Ct 值差（ ΔCt ）和预先测得的标准曲线来获得样本中靶标的起始浓度。同时，通过检测内标能够监测样本中是否有 PCR 抑制物，避免假阴性结果的发生。

本试剂盒采用 UNG-dUTP 防污染措施，利用 UNG 酶将反应管中可能存在的前次扩增产物污染充分降解，以排除由此引起的假阳性检测结果。

【主要组成成分】

组分名称	主要成分	规格	
		32 测试/盒	96 测试/盒
[HCV PCR 反应液]	含<1%引物、<1%探针、<10% Tris、<10% KCl、<1% MgCl ₂ 、<1% dNTP	480μL×1 支	480μL×3 支
[HCV PCR 酶混合液]	<10% Taq 酶、<1%逆转录酶、<1% RNasin	320μL×1 支	320μL×3 支
[HCV 内标]	含<1%内标 RNA 假病毒	960μL×1 支	960μL×3 支
[阴性对照]	含 HCV RNA 检测为阴性的血清或血浆、防腐剂	800μL×1 支	800μL×3 支
[HCV 弱阳性对照]	含<1% HCV RNA 假病毒	800μL×1 支	800μL×3 支
[HCV 强阳性对照]	含<1% HCV RNA 假病毒	800μL×1 支	800μL×3 支

注：1. 不同批次的试剂盒各组分不可以互换使用。

2. 需要但未提供产品：核酸提取试剂（生产厂家：上海科华生物工程股份有限公司；备案证号：沪徐械备 20200001 号）。需使用者自备。

3. 本试剂盒溯源至世界卫生组织（WHO）HCV RNA 国际标准品。

【储存条件及有效期】

1. 本试剂盒应在-20±5℃避光保存，有效期为 12 个月。

2. 反复冻融次数不得超过 3 次。本试剂盒于 2~8℃暂存不应超过 3 天。本试剂盒各组分开封后置于-20±5℃继续避光储存不得超过 30 天。

3. 本试剂盒应在-20±5℃避光运输不超过 5 天。

4. 生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本类型：人血清或血浆样本。

2. 样本采集：采集血清样本时，应立即采集分离为好，如不可行，应在 6 小时内必须分离、收集血清（切勿吸入红细胞），并将血清转移至一次性使用的无 RNA 酶的无菌离心管中。采集血浆样本时，采用含有 EDTA 或枸橼酸钠（ACD）作为抗凝剂的采血管（不可用肝素抗凝），分离血浆（切勿吸入红细胞），转移至一次性使用的无 RNA 酶的无菌离心管中。

3. 存放：血清或血浆样本在室温（10~30℃）下至多保存 8 小时；2~8℃下保存不超过 72 小时；-20±5℃至多保存 3 个月、-70℃及以下至多保存 4 个月，反复冻融不宜超过 3 次。

4. 样本用量：单次检测样本量为 400μL。

【检验方法】

1 样本处理（在样本处理区进行）

待测样本核酸提取采用已获得备案证的核酸提取试剂盒，使用上海科华生物工程股份有限公司的核酸提取试剂（备案证号：沪徐械备 20200001 号），使用该核酸提取试剂盒在配套的全自动核酸提取工作站上进行核酸提取。

每次提取需 400μL 待测样本和 30μL [HCV 内标]，试剂盒内对照品（[HCV 强阳性对照]、[HCV 弱阳性对照]、[阴性对照]）须与待测样本一起提取，提取过程请严格按照其说明书进行。

2 核酸扩增

2.1 PCR试剂准备（在试剂准备区进行）

取试剂盒中[HCV PCR反应液]、[HCV PCR酶混合液]室温融化混匀后，振荡5-10秒，瞬时离心后转移到样本处理区备用。

2.2 加样（在样本处理区进行）

经全自动核酸提取工作站完成核酸提取流程后，由自动化移液平台完成[HCV PCR反应液]、[HCV PCR酶混合液]的分装、加样。每个反应加入15μl [HCV PCR反应液]、10μl [HCV PCR酶混合液] 和 25 μL 核酸模板。取出PCR板贴膜或取出八连管盖上管盖后转移至扩增检测区。

2.3 PCR扩增检测（在扩增检测区进行）

2.3.1 将反应管或反应板放入荧光PCR扩增仪进行扩增检测。

2.3.2 循环参数设定：（请参照仪器的操作软件进行设置）

步骤		温度	时间	循环数
1	UNG酶反应	25℃	5分钟	1
2	逆转录反应	50℃	25分钟	1
3	预变性	95℃	2分钟	1
4	变性	95℃	10秒	5
	退火	55℃	20秒	
	延伸	72℃	20秒	
5	变性	95℃	10秒	40
	退火、延伸及检测荧光	60℃	45秒	
步骤5中60℃时采集荧光，检测通道：HCV RNA（FAM）、内标（ROX）。				

2.3.3 样本设置，在仪器软件的相应样本设置窗口内填写各样本的名称、类型。

3 检验结果

3.1 根据不同的仪器、样本检测的具体情况设置基线，阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方。

3.2 根据试剂盒标曲附页中的线性方程进行样本浓度的计算（具体参数见试剂盒中的附页）；将样本靶标 Ct 值减去内标 Ct 值得到 ΔCt，强阳性对照的 ΔCt 减去附页中提供的校正参数 ΔG 得到矫正值，本次实验中所有样本的 ΔCt 减去矫正值得到矫正后的 ΔCt，将矫正后的 ΔCt 代入方程式（Y=aX+b）中的 Y，计算样本浓度的对数值 X，然后换算为样本的浓度值 IU/mL（浓度值=10^X）。

4 质控标准

4.1 阴性对照：检测结果应为阴性，且内标Ct：20≤Ct值≤28。

4.2 HCV强阳性对照：检测浓度值为5×10³~4×10⁴ IU/mL。

4.3 HCV弱阳性对照：检测浓度值为1×10²~1×10³ IU/mL。

4.4 应同时满足上述3项条件，否则试验无效。

【阳性判断值或参考区间】

通过参考值的研究试验确定，HCV RNA检测Ct值<40，内标Ct的参考值为20≤Ct≤28。

【检验结果的解释】

检测结果	结果判定
无数值且内标无数值	检测可能受到抑制，需要复测或稀释后复测。
无数值且内标 20≤Ct 值 ≤28	未检出 HCV RNA 或样本中 HCV RNA 含量低于试剂盒检出限。
<30IU/mL，且有数值	低于试剂盒定量检测线性范围下限，所测定量结果仅供参考，报告上注明<30IU/mL，检出 HCV RNA。
30~1.0×10 ⁸ IU/mL	直接报告阳性及相应的病毒载量。

>1.0×10 ⁸ IU/mL	高于试剂盒定量检测线性范围上限,所测量结果仅供参考,报告上注明>1.0×10 ⁸ IU/mL。若需准确定量,可根据检测结果,将该样本用 HCV RNA 阴性血清或血浆稀释至线性范围后复测。
----------------------------	---

【检验方法的局限性】

1. 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. 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。
3. 因样本量有限,该产品针对4型和5型的检测性能尚无充分临床评价数据支持。

【产品性能指标】

1. 外观:外包装完好无破损。试剂盒内液体组分齐全,密封良好,无漏液现象。标签及说明书齐全,字迹清楚。
2. 线性范围:30IU~1×10⁸ IU/mL。检测国家HCV RNA最低检出限参考品稀释样或企业内部线性参考品稀释样,在试剂盒线性区间内,线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。
3. 准确度:检测国家HCV RNA国家最低检出限参考品稀释样,均为阳性,且检测结果应符合国家参考品准确性范围要求;或检测企业内部线性参考品稀释样,均为阳性,且理论浓度与实测浓度对数值的绝对偏差不超过±0.5个对数数量级。
4. 阴性参考品符合率:检测国家HCV RNA阴性参考品或企业内部阴性参考品N1~N10共10份,检测结果应为阴性,且阴性符合率应为10/10。
5. 阳性参考品符合率:检测国家HCV RNA阳性参考品P1~P10共10份,检测结果应为阳性,且阳性符合率应为10/10;或检测企业内部阳性参考品P1~P18共18份,检测结果应为阳性,且阳性符合率应为18/18。
6. 精密度:检测国家HCV RNA最低检出限参考品稀释样或企业内部精密度参考品稀释样,分别稀释到高、低两个浓度,各检测10次,定量结果对数值的变异系数(CV)应≤5%。
7. 检出限:12.5IU/mL。
8. 定量限:30IU/mL。
9. 特异性
 - 1) 交叉反应:本试剂盒对人巨细胞病毒、E-B病毒、西尼罗病毒、登革病毒、人类免疫缺陷病毒1、2型、乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、梅毒螺旋体、人类疱疹病毒6型、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、甲型流感病毒、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌均无特异性扩增。
 - 2) 干扰物质:样本中血红蛋白水平低于2g/L、甘油三酯水平低于30g/L、胆红素水平低于0.2g/L、利巴韦林水平低于12μg/mL、干扰素IFNα 2a低于7ng/mL、聚乙二醇干扰素α-2b低于30ng/mL、干扰素IFNα 2b低于160ng/mL、干扰素IFNα 1b低于3ng/mL、聚乙二醇干扰素α-2a低于50ng/mL、粒细胞刺激因子低于1.5ng/mL、系统性红斑狼疮患者血、抗核抗体低于600AU/mL、类风湿因子RF低于100IU/mL、总IgG低于20g/L对本试剂盒HCV RNA的定量检测没有干扰。
10. 亚型检测能力:本试剂盒检测丙型肝炎病毒基因型别包括1~6型。已评估所有覆盖型别的检出限、定量限和线性。
11. 临床评价:本产品在三家临床试验机构进行临床试验,共纳入530例样本统计分析,本产品与比对试剂的阳性符合率100.00%、阴性符合率95.45%、总符合率 99.43%。

【注意事项】

1. 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员,应严格按照说明书要求进行操作。
2. 本试剂盒为体外诊断试剂,仅供体外诊断。
3. 肝素抑制PCR反应,以血浆作为待测样本时避免使用肝素抗凝管。
4. 实验时应穿工作服,戴一次性手套(经常替换手套),使用一次性用品。
5. 试剂盒各组分使用前请充分融化并混匀。
6. 样本采集及储存过程避免样本间交叉污染,在样本处理阶段建议使用生物安全柜。
7. 操作过程中用到的生物安全柜、移液器、离心管、扩增仪等仪器设备推荐用75%乙醇进行消毒,操作过程中用到的工作台面推荐使用0.1~1%的次氯酸溶液消毒。
8. 试剂盒内阴性对照或其他可能含有人源物质的组分,虽已经通过了HBsAg、HIV1/2抗体、HCV抗体项目的检测,使用PCR技术未检测到HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA,但截至目前,没有任何一项检测可以确保绝对安全,故仍应将这些组分作为潜在传染源对待。
9. 实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。实验人员必须进行专业培训;实验过程应分区进行(试剂准备区、样本处理区、扩增检测区),实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备,各区各阶段用品不得交叉使用;各区间人员流动及空气流向应有严格要求,最大限度避免交叉污染;实验用消耗品(如离心管、吸头等)应有合理的清洁和质检程序,避免污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。
10. 本试剂盒内含叠氮钠组分,叠氮钠可与铅和铜管道设备发生反应从而形成易爆的金属叠氮化合物。因此在处理将其冲入下水道时,使用大量水冲洗排水设备防止叠氮化合物积累。

【参考文献】

1. van Leeuwen, H. C., Reusken, C. B., Roeten, M., Dalebout, T. J., Riezu-Boj, J. I., Ruiz, J., and W. J. Spaan (2004). Evolution of naturally occurring 5' non-translated region variants of hepatitis C virus genotype 1b in selectable

- replicons. J. Gen. Virol. 85, 1859-1866.
2. Halfon, P., M. Bourliere, G. Penaranda, H. Khiri, and D. Ouzan. 2006. Real-time PCR assays for hepatitis C virus (HCV) RNA quantitation are adequate for clinical management of patients with chronic HCV infection. J. Clin. Microbiol. 44:2507-2511.
 3. Pawlotsky, J. M. (2003). Hepatitis C virus genetic variability, pathogenic and clinical implications. Clin. Liver Dis. 7, 45-66.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海科华生物工程股份有限公司

住所：上海市徐汇区钦州北路 1189 号

联系方式：

售后服务单位名称：

联系方式：

生产地址：上海市徐汇区桂平路 701 号

生产许可证编号：

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】