

4. 每次实验应设置阴、阳性对照品。
5. 操作人员应经过专业培训，具有一定经验和操作技能。
6. 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。
7. 实验中接触过标本的废弃物（如吸头）、扩增完毕的离心管、标本等应进行无害化处理后方可丢弃。
8. 试剂使用前应在常温下充分融化并混匀。
9. PCR 反应混合液应避免保存。
10. 反应管中尽量避免气泡存在，管盖需盖紧。
11. 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] 丙型肝炎防治指南. 中华医学会肝病分会, 中华医学会传染病与寄生虫病学分会.
- [2] Philippe Halfon, Marc Bourlière, Guillaume Pénaranda, Hacène Khiri, and Denis Ouzan 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., Jul 2006; 44: 2507 - 2511.
- [3] Mel Krajden, Rainer Ziermann, Asphani Khan, Annie Mak Qualitative Detection of Hepatitis C Virus RNA: Comparison of Analytical Sensitivity, Clinical Performance, and Workflow of the Cobas Amplicor HCV Test Version 2.0 and the HCV RNA Transcription-Mediated Amplification Qualitative Assay J. Clin. Microbiol., Aug 2002; 40: 2903 - 2907.
- [4] Fabrizio Fabrizi, Giovanna Lunghi, Filippo Aucella Novel Assay Using Total Hepatitis C Virus (HCV) Core Antigen quantification for Diagnosis of HCV Infection in Dialysis Patients J. Clin. Microbiol., Jan 2005; 43: 414 - 420.

【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：上海市闵行区新骏环路 588 号 26 幢

生产许可证编号：沪食药监械生产许 20081591 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20153400264

【说明书核准日期及修改日期】 2022-5-1

Liferiver

货号：Z-HR-0008-02

丙型肝炎病毒（HCV）核酸定量测定试剂盒（荧光 PCR 法）使用说明书

【产品名称】

通用名称：丙型肝炎病毒（HCV）核酸定量测定试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 25 人份 / 盒、50 人份 / 盒。

【预期用途】 本试剂盒可对血清、血浆中丙型肝炎病毒 RNA 核酸片段进行荧光定量 RT-PCR 检测。

丙型肝炎病毒（Hepatitis C Virus, HCV）是丙型肝炎的病原因子，在人群中通常经血液传播。血液中 HCV RNA 的实时 RT-PCR 检测已成为 HCV 诊断、丙型肝炎患者抗病毒药物治疗疗效监测的重要手段。

【检验原理】 本试剂盒采用丙型肝炎病毒特异性引物及荧光探针，应用一步法聚合酶链式反应（RT-PCR）技术结合 Taqman 技术，对 HCV 的保守区域的特异性 RNA 核酸片段进行定量荧光 RT-PCR 检测。

【主要组成成分】

名称	序号	组分	包装规格		体积 / 人份	主要成分	备注
			25 人份	50 人份			
核糖核酸 (RNA) 抽提试剂	1	亲和柱	25 管	50 管	1 管		
	2	结合缓冲液	12.5mL×1	25mL×1	500μL	硫氰酸胍、EDTA	
	3	洗涤液 A	26mL×1	52mL×1	1mL	硫氰酸胍、吐温 20	
	4	洗涤液 W	7mL×1	14mL×1	1mL	水	使用前加 21mL (25 人份) / 42mL (50 人份) 100%乙醇
	5	洗脱液	2.5mL×1	5mL×1	50μL	Tris	
	6	磁珠	0.6mL×1	1.2mL×1	20μL		
	7	RNA 助沉剂	干粉×1	干粉×1	6μL	RNA 助沉剂	使用前加 200μL (25 人份) / 400μL (50 人份) 洗脱液
PCR 检测系统试剂	8	HCV RNA 定量检测混合液	513μL×1	988μL×1	19μL	1 对引物、2 条探针及 RT-PCR Mix	
	9	RT-PCR 酶	27μL×1	52μL×1	1μL	逆转录酶、Taq DNA 聚合酶	
	10	HCV 内标	30μL×1	60μL×1	1μL	含目的基因片段的缺陷性病毒	
	11	HCV 阴性对照品	150μL×1	150μL×1		灭活人 HCV 阴性血清	检测结果应为阴性
	12	HCV 临界阳性对照品	150μL×1	150μL×1		含目的基因片段的缺陷性病毒	5×10 ³ ~5×10 ⁴ IU/mL
	13	HCV 标准品 I	20μL×1	20μL×1			5×10 ⁷ IU/mL
	14	HCV 标准品 II	20μL×1	20μL×1			5×10 ⁶ IU/mL
	15	HCV 标准品 III	20μL×1	20μL×1			5×10 ⁵ IU/mL
	16	HCV 标准品 IV	20μL×1	20μL×1			5×10 ⁴ IU/mL

说明：不同批号的组分不可以互换使用。

核酸抽提自备试剂：乙醇（AR）

【储存条件及有效期】 核糖核酸（RNA）抽提试剂应在≤25℃避光保存，PCR 检测系统试剂应在≤-20℃低温避光保存，有效期 6 个月。

采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封进行运输；试剂盒反复冻融不宜超过 3 次，开瓶后请于 2 个月内使用。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® 7000 型荧光定量 PCR 仪、SLAN 荧光定量 PCR 检测系统及相应软件。

【样本要求】

血清：用一次性的针筒抽取患者静脉血 2mL，置于灭菌的一次性非抗凝试管中，取分离出的血清 0.2mL 送检。

血浆：用一次性的针筒抽取患者静脉血 2mL，置于灭菌的一次性抗凝（非肝素）试管中，取分离出的血浆 0.2mL 送检。溶血标本应重新抽取血样。若甘油三酯含量超过 6 mmol/L 或肉眼可见血浆/血清呈白色混浊状的标本，应 4℃ 13000rpm 离心 15min，吸取下层清亮血清或血浆送检。血清或血浆可在 2℃~8℃放置 72 小时。

【检验方法】

1. 标本、对照品的 RNA 提取处理 (使用 核糖核酸 (RNA) 抽提试剂)

1) 试剂准备

a. 将 RNA 助沉剂、磁珠、内标加入至结合缓冲液 (按下表浓度配方), 混匀。该混合液在本说明书中称为“结合液”。

结合液	组成 (每份)
结合缓冲液	500 μ L
RNA 助沉剂	6 μ L
磁珠	20 μ L
HCV 内标	1 μ L

注: 磁珠使用前将磁珠震荡混匀; RNA 助沉剂使用前加 200 μ L/400 μ L 洗脱液振荡混匀 10sec, 使其充分溶解。

b. 加乙醇至洗涤液中混匀

使用前, 加 21mL (25 人份) / 42mL (50 人份) 100% 乙醇至洗涤液中, 混匀; 并作好标记。

注: 保存时确保将瓶盖拧紧, 以防止乙醇挥发。

2) RNA 抽提操作步骤

a. 加 140 μ L 标本、对照品分别至 527 μ L 结合液:

- 取 527 μ L 结合液至 1.5mL 离心管中
- 在上述离心管中加入 140 μ L 样品, 将吸头轻轻地浸入结合液中, 以防止液体溅出导致的交叉污染。
- 涡旋振荡 10s 或反复颠倒 5~10 次 (使磁珠均匀分散至缓冲液, 完全裂解病毒, 并使 RNA 与磁珠相结合), 静置 3min 以上。

b. 分离磁珠: 吸取以上混匀静体系 667 μ L 于亲和柱中, 13000rpm 离心 40sec; 弃去收集管废液。

c. 50 μ L 洗涤液 A 洗涤 2 次: 加入 500 μ L 洗涤液 A, 13000rpm 离心 40sec; 弃去收集管废液; 再重复一次。

d. 50 μ L 洗涤液 W 洗涤 2 次: 加入 500 μ L 洗涤液 W, 13000rpm 离心 15sec; 弃去收集管废液; 再重复一次。

e. 充分干燥: 亲和柱放入离心机中 13000rpm 离心 2min。

f. 50 μ L 洗脱液洗脱 RNA:

- 亲和柱放入 1.5mL 无 RNase 的离心管中, 加入 50 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热洗脱液, 室温放置 2min。
- 13000rpm 离心 2min, RNA 被洗脱于无 RNase 的离心管中备用或将其保存于 -20 $^{\circ}$ C

3) 标准品无需抽提, 直接加入 PCR 反应体系。

2. 试剂配制 取 n $\times$ 19 μ L HCV RNA 定量检测混合液、n $\times$ 1 μ L RT-PCR 酶 (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 20 μ L 置于薄壁 PCR 反应管或 PCR 反应板中, 然后将已处理的标本、临界阳性对照品、阴性对照品的 RNA 各 5 μ L 和标准品 I、II、III、IV 各 5 μ L 分别加入薄壁 PCR 反应管或 PCR 反应板中, 盖好薄壁 PCR 反应管盖或 PCR 反应板盖, 立即进行 PCR 扩增反应。

4. PCR 扩增 反应管置于定量荧光 PCR 仪上, 推荐循环参数设置:

45 $^{\circ}$ C $\times$ 10min; 95 $^{\circ}$ C $\times$ 15min; 再按 95 $^{\circ}$ C $\times$ 15sec $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C $\times$ 60sec, 循环 50 次; 单点荧光检测在 60 $^{\circ}$ C, 反应体系为 25 μ L。

荧光通道检测选择: 选用 FAM 通道和 VIC 通道。

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. 校准程序 进行定量检测时需要进行校准程序, 标准品处理和加样在检验方法的 1 和 3 中已经说明; 实验结束后将标准品 I、II、III、IV 的浓度输入仪器软件中, 仪器自动生成标准曲线, 点击 Analyze (ABI Prism $^{\circ}$ 7000 型) 或数据分析 (SLAN 荧光定量 PCR 检测系统) 选项, 仪器自动生成标准曲线。

7. 质量控制 HCV 阴性对照品 FAM 通道检测结果应为: 仪器 Qty 栏显示 UNDET (ABI Prism $^{\circ}$ 7000 型) 或测量结果栏显示 <250 (SLAN 荧光定量 PCR 检测系统), 且 VIC 通道检测 Ct 值应 $\leq$ 35。HCV 临界阳性对照品 FAM 通道检测结果应为: 仪器 Qty (测量结果) 栏显示在 5 $\times$ 10³ IU/mL~5 $\times$ 10⁴ IU/mL 范围内, 标准曲线相关系数应 $\leq$ -0.98, 否则实验视为无效。

8. 试验结果的计算

8.1 待检标本 FAM 通道检测结果 Qty 栏显示 UNDET (ABI Prism $^{\circ}$ 7000 型) 或测量结果栏显示 <250 (SLAN 荧光定量 PCR 检

测系统), 且 VIC 通道检测 Ct 值 $\leq$ 35, 表示检测标本低于检测限, 报告为阴性;

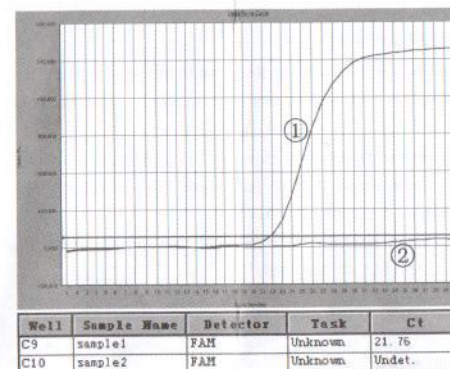
8.2 待检标本 FAM 通道和 VIC 通道检测结果 Qty 栏均显示 UNDET (ABI Prism $^{\circ}$ 7000 型) 或测量结果栏显示 <250 (SLAN 荧光定量 PCR 检测系统) 时, 需重复试验, 若结果不变则说明标本中存在 PCR 反应抑制物, 建议用其他提取方法重复进行确认;

8.3 待检标本 FAM 通道检测结果 Qty (测量结果) 栏显示 <10³ IU/mL 时, 检测结果报告为阳性, 定量检测结果仅供参考;

8.4 待检标本 FAM 通道检测结果 Qty (测量结果) 栏显示在 10³ IU/mL~10⁷ IU/mL 范围内, 可直接报告相应的定量检测结果;

8.5 待检标本 FAM 通道检测结果 Qty (测量结果) 栏显示 >10⁷ IU/mL, 即可直接报告为 >10⁷ IU/mL, 如需精确定量可用阴性血清按 10 倍梯度做相应稀释, 使其检测结果落在 10³ IU/mL~10⁷ IU/mL 范围内再重新测定, 测定结果应根据稀释倍数进行计算。

注: 扩增曲线图释如下



图中:

①为典型的阳性扩增曲线, 呈 S 型。

②为阴性样本检测结果。

【阳性判断值】阴性。待检标本 FAM 通道检测结果 Qty 栏显示 UNDET (ABI Prism $^{\circ}$ 7000 型) 或测量结果栏显示 <250 (SLAN 荧光定量 PCR 检测系统), 且 VIC 通道检测 Ct 值 $\leq$ 35, 表示检测标本低于检测限, 报告为阴性。

【检验结果的解释】实验室环境污染, 试剂污染, 标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, 出现假阴性或定量检测不准确的结果。HCV 阴性标本或 HCV 阴性对照品 VIC 通道显示 UNDET 表明 PCR 反应受到抑制或提取不当。试验结果仅供临床参考, 不作为治疗或其他临床管理的唯一依据。

【检验方法的局限性】当检测标本中被检核酸浓度含量低于最低检测限 1 $\times$ 10³ IU/mL 时可能会发生假阴性的结果。阴性结果仅说明低于本试剂盒的检测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。

【产品性能指标】

- 本试剂盒最低检测限: 1 $\times$ 10³ IU/mL
- 本试剂盒线性检测范围: 10³ IU/mL~10⁷ IU/mL
- 本试剂盒与甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、巨细胞病毒、B19 病毒、EB 病毒、单纯疱疹病毒均无交叉反应。
- 阳性参考品符合率: HCV RNA 阳性参考品检测结果不得出现假阴性, 符合率 10/10。
- 阴性参考品符合率: HCV RNA 阴性参考品检测结果不得出现假阳性, 符合率 10/10。
- 最低检出量定量标准品: 检测结果符合质量标准。

【注意事项】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; 标本处理、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。
- 试剂准备和标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。