

丙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光法）说明书

【产品名称】

通用名称：丙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于人血清或血浆中丙型肝炎病毒核酸的定量检测。

丙型肝炎病毒呈球形，为单股正链 RNA 病毒，丙型肝炎病毒主要血源传播，国外 30-90%输血后肝炎为丙型肝炎，我国输血后肝炎中丙型肝炎占 1/3。此外还可通过其他方式如母婴垂直传播，家庭日常接触和性传播等。传统以检测血清感染标志物来判定丙型肝炎病毒感染无法对患者丙型肝炎病毒感染复制程度作出判断。丙型肝炎病毒核酸定量检测技术使我们对患者体内丙型肝炎病毒复制及传染性有更直接地了解，丙型肝炎病毒 RNA 阳性是表示丙型肝炎病毒复制的最可靠指标，也是反映丙肝的感染状态和治疗效果的重要指标。用于丙型肝炎的辅助诊断及疗程监控。

适应症：由丙型肝炎病毒感染引起的肝炎疾病。

【检验原理】

本试剂盒选用丙型肝炎病毒保守基因片段设计特异引物及特异 Taqman 探针，该探针能与引物扩增区域中间的一段 cDNA 模板发生特异性结合，在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，从而实现在全封闭反应体系中对丙型肝炎病毒核酸的自动化检测。

【主要组成成分】

组成	成分	规格
核酸扩增试剂		
RT-PCR 主反应液	三羟甲基氨基甲烷(pH8.3)、氯化钾、氯化镁、脱氧核苷三磷酸 dNTPs、牛血清白蛋白 0.1μg/μL	1 mL×1
酶混合液	含 Taq DNA 酶及逆转录酶	20μL×1
荧光探针	含引物和探针	14μL×1
内标模板	含内标模板	350μL×1
对照品		
阴性对照	主要成份为灭活后的正常人血清	350μL×1
强阳性对照 10 ⁷ ~10 ⁶ IU/mL	主要成份为非感染性体外转录 RNA	350μL×1
临界阳性对照 10 ⁴ ~10 ³ IU/mL	主要成份为非感染性体外转录 RNA	350μL×1
校准品		
定量校准品 1# （1.0-8.0）×10 ⁴ IU/ mL	均为人工构建的体外转录 RNA	250μL×1
定量校准品 2# （1.0-8.0）×10 ⁵ IU/ mL		250μL×1
定量校准品 3# （1.0-8.0）×10 ⁶ IU/ mL		250μL×1
定量校准品 4# （1.0-8.0）×10 ⁷ IU/ mL		250μL×1

注：定量校准品具体的参数根据批号不同而不同。详见试剂盒内给定值。不同批号试剂盒中各

组份不可以互换。

自备仪器：

高速台式冷冻离心机、移液枪、一次性耗材（无酶吸头、离心管、手套、帽子等）、专用工作服、工作鞋、办公用品等。

【储存条件及有效期】

试剂为透明液体，保存于-20℃±5℃，不宜反复冻融，使用前应在室温下完全融化，并充分振荡混匀后稍事离心；所有试剂应避光保存；有效期 12 个月。

生产日期及使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

ABI-7500 定量荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 样本种类：血清或血浆
2. 血清以新鲜采集分离为好，采血 6 小时内必须分离、收集血清，并将血清转移至一次性使用无 RNA 酶的无菌微量离心管中。血浆样本以乙二胺四乙酸、柠檬酸钠、草酸钠或 ACD 液抗凝，不能用肝素作抗凝剂。
3. 样本储存：待测样本在 2-8℃保存不应超过 24hr，-20℃保存不应超过三个月，-70℃以下可长期保存。
4. 避免反复冻融（最多冻融三次）。
5. 样本运输：在冷冻状态下运输。

【检验方法】

1. 样本处理（样本处理区）

使用我公司的核酸提取或纯化试剂（浙杭械备 20210094 号），使用前在该试剂盒的裂解液中加入 4μL/mL 内标模板后再进行样本处理，样本处理具体步骤见核酸提取或纯化试剂说明书；或使用我公司的核酸提取或纯化试剂（浙杭械备 20150134 号）处理样本，使用前在该试剂盒的裂解液中加入 10μL /人份内标模板后再进行样本处理，样本处理具体步骤见核酸提取或纯化试剂说明书。

2. 扩增试剂准备（PCR 前准备期）

从试剂盒中取出 RT-PCR 主反应液、酶混合液和荧光探针，在室温下融化并振荡混匀简短离心。每个测试反应体系配制如下：

试剂	RT-PCR 主反应液	酶混合液	荧光探针
用量（μL）	19	0.6	0.4

计算好各试剂使用量，加入一适当体积离心管中，充分混匀，简短离心，向设定的 n 个（n=样本数+1 管强阳性对照+1 管临界阳性对照+1 管阴性对照+4 个定量校准品）PCR 反应管中分别加入 20μL，转移至样本处理区。

3. 加样（样本处理区）

在 PCR 反应管中分别加入步骤 1 中制备的 RNA 溶液 20μL，盖紧管盖，简短离心，将反应管放入荧光 PCR 检测仪中，记录样本摆放顺序。

4. RT-PCR 反应（检测区）

步骤	循环数	温度(℃)	反应时间(min:sec)
1	1	42	30:00
2	1	95	3:00

3	5	95	00:10
		55	00:30
		72	1:00
4	40	95	00:05
		60	00:30

荧光信号的收集定为 FAM，内标检测荧光信号收集定位 VIC，数据的采集定在 60℃。

结果分析条件设定：

使用 ABI PRISM 7500 荧光 PCR 检测仪进行结果分析时基线（baseline）取 6-10 或 6-15 个循环的荧光信号；阈值（threshold）设定原则以基线刚好超过阴性对照扩增曲线的最高点，且 Ct 值=40 为准。标准曲线的线性相关系数 $|r| \geq 0.98$ 。在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，阴性对照内标检测 CT 值应小于 40，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差，并重新检测。

质控标准

1. 本试剂盒的定量线性范围：500≤测定结果≤10⁸IU/mL。
2. 将定量校准品 1-4 的浓度输入，仪器自动以定量校准品浓度的对数值为横坐标，以其实际测得的 Ct 值为纵坐标给出标准曲线，标准曲线的线性相关系数 $|r| \geq 0.98$ ，否则实验无效。
3. 阴性对照测定结果为 0，Ct 值一栏显示为 undet，且内标检测 CT 值小于 40。
4. 强阳性对照、临界阳性对照的定量结果在试剂盒提示的规定允许范围内。

【检验结果的解释】

1. 对于 500≤测定结果≤10⁸IU/mL 的样本，提示本次测定结果在试剂盒有效定量检测线性范围内。可直接报告数据。
2. 对于测定结果>10⁸IU/mL 的样本，提示病毒含量高于试剂盒定量检测线性范围上限，所测结果仅供参考，报告上注明>10⁸IU/mL。如需精确定量，可根据所测结果，将该样本用阴性血清稀释至试剂盒测定范围内复测。
3. 对于测定结果<500IU/mL 的样本，提示病毒含量低于试剂盒定量检测线性范围下限，所测结果仅供参考，报告上注明<10³IU/mL，并谨慎跟踪随访。
4. 测定结果为 0（Ct 值一栏为 undet）且内标检测 CT 值小于 40 的样本为丙型肝炎病毒 RNA 阴性，如果内标测定结果为阴性，应当考虑假阴性的可能，需要重新进行检测。

【检验方法的局限性】

1. 血浆样本不能用肝素作抗凝剂。
2. 不能直接作为临床确诊依据，仅供临床医生参考使用。

【产品性能指标】

1. 最低检出量为 500 IU/mL。
2. 定量检测范围为 500 IU/mL—8.0×10⁸IU/mL。
3. 本试剂盒对甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、丁型肝炎病毒、新型肝炎病毒、沙眼衣原体、淋球菌、单纯疱疹病毒、人乳头瘤病毒、解脲支原体、结核分支杆菌样本均无非特异性扩增。
4. 经过对胆红素（16 mg/L）、血红蛋白（0.4 g/mL）、血脂（4 mg/mL）、干扰素（500 U/mL）、IgG（50 g/L）临床常见样本的系统研究，此类样本不影响本试剂盒的定量检测结果。
5. 准确度：与国家标准品的绝对偏差不超过±0.5 个对数数量级。
6. 批内、批间不精密度：CV 值均小于 5%。

7. 试剂盒对于不同基因型的丙型肝炎病毒样本 1b、2a、3a、3b、6a 型均能够检测出阳性结果。

【注意事项】

1. 待测新鲜血清样本若不及时检测，应保存于-20℃或-70℃。
2. 试剂盒各组分使用前应充分融化混匀，离心数秒后使用。
3. PCR 操作各阶段应严格分区操作。
 - 1) PCR 前准备区：准备扩增所需试剂
 - 2) 样本处理区：处待测样本和对照品
 - 3) 检测区：PCR 扩增检测
4. 在试剂和样本准备阶段应分别使用负压超净台和生物安全柜以免污染。
5. 应穿专用工作服，戴一次性手套并经常替换，使用一次性用品。
6. PCR 操作人员应具有经验和受过培训。
7. 操作过程中用到的超净台、移液器、离心机等仪器设备应经常用 10%次氯酸或 70%酒精或紫外灯消毒。
8. 使用本试剂盒检测的样本具有传染性物质，请按传染病实验室检查规程操作。
9. 本试剂盒仅用于体外辅助诊断。

【参考文献】

Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

住所：杭州市西湖区振中路 210 号

注册人/生产企业联系方式：电话：0571-87775858；传真：0571-87775851

售后服务单位名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

售后服务单位联系方式：400-118-2266

生产地址：杭州市西湖区振中路 210 号；杭州市临安区开源街 8 号 3 幢（仓库地址）

生产许可证编号：浙食药监械生产许 20120007 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163400985

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期：2021.05.06

修改日期：2022.05.26