

人类免疫缺陷病毒1型核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名：人类免疫缺陷病毒1型核酸测定试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】24人份/盒、48人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人血浆样本中的人类免疫缺陷病毒1型核酸。

本试剂盒采用实时荧光定量PCR技术，用于HIV感染的治疗效果评估，不得用于血源筛查。

人类免疫缺陷病毒是一种感染人类免疫系统细胞的慢病毒，其中人类免疫缺陷病毒1型广泛分布于世界各地，是引起全世界获得性免疫缺陷综合征流行的病原。该病毒破坏人体的免疫能力，导致免疫系统失去抵抗力，而导致各种疾病及癌症得以在人体内生存，发展到最后，导致艾滋病（获得性免疫缺陷综合征）。

【检验原理】

本试剂盒针对人类免疫缺陷病毒1型核酸保守区设计的特异性引物、特异荧光探针，配以PCR反应液，在荧光定量PCR仪上，应用实时荧光定量PCR检测技术，通过荧光信号的变化实现人类免疫缺陷病毒1型RNA的定量检测。

本试剂盒设置了内标系统，内标参与提取和扩增过程，通过检测内标是否正常来监测实验过程是否正常，避免PCR假阴性。

本试剂盒设置了内参比荧光ROX，用于校正加样误差和管间差异，便于PCR仪自动分析，使定量更准确。

【主要组成成分】

本试剂盒由以下组份构成：

序号	试剂名称	规格与装量 (24人份/盒)	规格与装量 (48人份/盒)	主要成分
1	HIV PCR反应液	624μL/管×1管	624μL/管×2管	引物、探针、dNTPs、PCR buffer
2	HIV 酶混合液	72μL/管×1管	72μL/管×2管	Tth酶、Taq酶
3	RT增强剂	50μL/管×1管	50μL/管×1管	硫酸锰
4	HIV 内标	25μL/管×1管	25μL/管×1管	含内标片段的假病毒
5	HIV 定量参考品A	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	含HIV片段假病毒
6	HIV 定量参考品B	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	含HIV片段假病毒
7	HIV 定量参考品C	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	含HIV片段假病毒
8	HIV 定量参考品D	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	含HIV片段假病毒
9	HIV 阴性对照	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	灭活的阴性血浆
10	HIV 强阳性对照	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	含HIV片段假病毒
11	HIV 弱阳性对照	1.6mL/管×1管	1.6mL/管×1管	含HIV片段假病毒

备注：1）不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。

2）HIV 定量参考品A~D的具体浓度请参照试剂盒内给定值。

3）提取试剂盒使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（湘长械备20150021号）进行核酸提取。

【储存条件及有效期】

试剂应避光密封储存于-20±5℃，避免反复冻融（各组分冻融次数不超过5次）；

运输采用泡沫箱加蓄冷剂的方式运输5天，温度不超过20℃；

试剂盒有效期为12个月，生产日期，失效日期请见外包装盒。

【适用仪器】

适用于ABI7500 荧光PCR仪、Life Technologies QuantStudio™5 荧光PCR仪、SLAN-96P 全自动医用PCR分析系统、Roche Cobas Z480 荧光PCR仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：血浆样本。

2. 样本采集：消毒局部皮肤，用加有抗凝剂（EDTA 钠盐或钾盐、枸橼酸钠）的真空采血管，抽取适量静脉血，或用一次性注射器抽取静脉血，转移至加有抗凝剂的试管中，轻轻颠倒混匀6-8次，待样本自行析出血浆或1500-3000r/min离心15min，分离出血浆，吸出置于1.5mL 灭菌离心管中备用。

3. 样本保存、运送和接受：经上述处理后的待测血浆样本可存放于4℃（4天内进行检测），3个月以内应存放于-20℃以下，3个月以上长期保存应置于-70℃以下。用于病毒载量检测的样品应在-20℃以下运输。标本的运送和接受应符合《全国艾滋病检测技术规范》（2009年修订版）中的要求，要获得相应部门批准并由具有资质的人员专程护送，采用三层容器对样品进行包装，随样品应附有与样品唯一性编码相对应的送检单。送检单应标明受检者姓名、样品种类等信息，并应放置在第二层和第三层容器之间。样品包裹必须在具有处理感染性材料能力的实验室内、由经过培训的、穿戴防护衣、戴口罩、防护眼镜的工作人员在生物安全柜中打开，用后的包裹应及时进行消毒。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1 取出试剂盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温，混匀后备用。

1.2 根据待测样本、阴性对照、弱阳性对照、强阳性对照、定量参考品的数量，按比例（HIV PCR 反应液 26μL/人份+ HIV 酶混合液 3μL/人份+RT 增强剂 1μL/人份）取相应量的 HIV PCR 反应液、HIV 酶混合液及 RT 增强剂，充分混匀成 PCR 混合液，2000rpm 离心 10s 后备用。

2. 样本处理与加样（在样本处理区进行）（HIV 阴性对照、HIV 弱阳性对照、HIV 强阳性对照、HIV 定量参考品 A~D 与待测样本同步处理）

2.1 样本的处理

取待测样本、HIV 阴性对照、HIV 弱阳性对照、HIV 强阳性对照、HIV 定量参考品 A~D 各 800μL，使用圣湘生物科技股份有限公司的“核酸提取或纯化试剂”（湘长械备20150021号），具体操作步骤请按核酸提取或纯化试剂说明书中的方法进行；本试剂盒中的内标溶液需参与提取，用量为0.4μL/测试。

2.2 加样

2.2.1 根据待测样本、HIV 阴性对照、HIV 弱阳性对照、HIV 强阳性对照、HIV 定量参考品 A~D 的数量，每个反应管加入 30μL PCR 混合液。

2.2.2 吸取上述处理好的样本、HIV 阴性对照、HIV 弱阳性对照、HIV 强阳性对照、HIV 定量参考品 A~D 各 30μL 加入 PCR 混合液中，盖好管盖，混匀并瞬时离心后转移到扩增区。

3. PCR 扩增（在扩增与分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

3.1 将PCR反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照、阳性对照、定量参考品A~D以及未知样本，并设置样本名称及定量参考品浓度。

3.2 荧光检测通道选择：

3.2.1 ABI 系列、宏石 SLAN 仪器：

1）选择FAM通道（Reporter: FAM, Quencher: none）检测HIV-RNA；2）选择HEX或VIC通道（Reporter: HEX/VIC, Quencher: none）检测HIV内标；3）参比荧光（Reference Dye）：选择ROX。

3.2.2 Roche 荧光PCR仪：

选择New Experiment，在setup设置面板Detection format下拉菜单中选择Dual Color Hydrolysis Probe/UPL Probe，在Customize下拉菜单中：1）选择FAM通道检测HIV-RNA；2）选择VIC/HEX/Yellow通道检测HIV内标。设置Reaction Volume为60。

3.3 循环参数设定：

步骤		温度	时间	循环数
1	预变性和酶激活	95℃	1 分钟	1

2	逆转录	60℃	30 分钟	1
3	cDNA 预变性	95℃	1 分钟	1
4	变性	95℃	15 秒	45
	退火, 延伸及荧光采集	58℃	30 秒*	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

*注: 由于 ABI7500 仪器原因, 不能设置为 30 秒, 可以设置为 31 秒。

4. 结果分析 (请参照各仪器使用说明书进行设置, 以下分析以 ABI 系列仪器为例)

反应结束后自动保存结果, 对人类免疫缺陷病毒的曲线和相应人类免疫缺陷病毒内标的曲线分别进行分析。根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值 (用户可根据实际情况自行调整, Start 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20, 调整阴性对照的扩增曲线使其平直或低于阈值线), 点击 Analyze 进行分析, 使各项参数符合下述“5. 质量控制”中的要求, 然后到 Plate 窗口下记录定量结果。

5. 质量控制

5.1 HIV 定量参考品 (A~D): 均检测为阳性, 且标准曲线相关系数 $|r| \geq 0.98$;

5.2 HIV 阴性对照: 无 Ct 值显示; HIV 内标检测为阳性, 且 $Ct \leq 40$;

5.3 HIV 强阳性对照: 检测浓度值的浓度范围 $1.58 \times 10^3 \sim 1.58 \times 10^6$ IU/mL;

5.4 HIV 弱阳性对照: 检测浓度值的浓度范围 $1.58 \times 10^2 \sim 1.58 \times 10^3$ IU/mL;

5.5 以上要求需在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 需重新进行。

【检验结果的解释】

1. 对于测定值在 $5.00E+01$ IU/mL ~ $1.00E+08$ IU/mL 之间的样本, 报告相应的测定结果;

2. 对于测定值 $>1.00E+08$ IU/mL 的样本, 报告注明 $>1.00E+08$ IU/mL。若需精确定量可根据结果适当稀释至 $1.00E+08$ IU/mL 以下再复测;

3. 对于测定值 $\geq 2.50E+01$ IU/mL, 而 $<5.00E+01$ IU/mL 的样本, 表明病毒载量低, 测定值仅供参考;

4. 对于测定值 <25 IU/mL 的样本, 同时, 内标检测为阳性且 $Ct \leq 40$, 则报告人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA 含量低于试剂盒检测下限; 若内标不正常 ($Ct > 40$ 或无数值), 则该样本的检测结果无效, 应查找并排除原因, 并对此样本进行重复实验。

【检验方法的局限性】

1. 本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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关, 其中任何失误都将会导致结果不准确。

3. 样本处理过程出现交叉污染, 会造成假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 准确性

检测中国食品药品检定研究院的人类免疫缺陷病毒核酸国家参考品中的线性参考品或经标化的企业参考品中的线性参考品, 定量结果符合质量标准。通过线性范围试验表明本试剂盒定量线性范围为 $5.00E+01$ IU/mL ~ $1.00E+08$ IU/mL。

2. 分析特异性

检测中国食品药品检定研究院的人类免疫缺陷病毒核酸国家参考品中的特异性参考品或检测企业参考品中的阴性参考品, 检测结果为阴性, 符合率为 100%。

对其他常见病原体 (乙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、人巨细胞病毒、Epstein-Barr 病毒、人类疱疹病毒 6 型、梅毒螺旋体、金黄色葡萄球菌、腺病毒、人类免疫缺陷病毒 2 型、风疹病毒、弓形虫、白色念珠菌、I/II 型人类嗜 T 细胞病毒) 检测结果均为阴性。

3. 亚型检测能力

能够对人类免疫缺陷病毒 1 型 M 组、O 组以及 N 组的亚型进行检测。检测中国食品药品检定研究院的人类免疫缺陷病毒核酸国家参考品中的阳性参考品或企业参考品中的阳性参考品, 检测结果为阳性, 符合率 100%。

4. 精密度

批内、批间精密度浓度对数值的变异系数 (CV%) $\leq 5\%$ 。

5. 最低检出限

检测中国食品药品检定研究院的人类免疫缺陷病毒核酸国家参考品中的灵敏度参考品或检测企业参考品中的最低检出限参考品, 检测结果符合质量标准。通过最低检出限试验确定本试剂盒的最低检出限为 25 IU/mL。

6. 定量限

通过定量限试验确定本试剂盒的定量限为 50 IU/mL。

7. 干扰物质

内源性干扰物血红蛋白 (≤ 2 g/dL)、总胆红素 (≤ 28 mg/dL)、甘油三酯 (≤ 3 g/dL)、总 IgG (≤ 40 mg/mL)、类风湿因子 (RF)、抗核抗体 (ANA) 对检测无影响。

血浆样本中分别加入一定比例的治疗药物, 含有 1.5 μ g/mL 的拉米夫定、3 μ g/mL 的齐多夫定、3000 U/mL 的 α -干扰素、6 μ g/mL 的去羟肌苷等对本试剂盒的检测无影响。

8. 临床性能

与已上市同类产品进行对比试验, 对 557 例临床血浆样本进行检测, 结果显示阳性符合率为 99.78%, 阴性符合率为 98.02%, 总符合率为 99.46%; 通过对两种试剂检测结果相关和回归分析, 相关系数 $|r|=0.987$, 回归曲线为 $y=0.992x+0.001$, 表明两种方法比例误差小。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测, 使用前请仔细阅读本说明书。

2. 实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。

3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行, 所用消耗品应灭菌后一次性使用, 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段用品不能交叉使用。

4. 所有检测样品应视为具有传染性物质, 实验过程中穿工作服, 戴一次性手套并经常更换手套以避免样品间的交叉污染; 样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求; 卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

5. 所有的试剂在使用前, 均需在室温下充分融化、混匀后使用。

6. 对于检测为阴性的样本, 应确定人类免疫缺陷病毒内标的扩增信号是否正常, 以保证实验操作和检测试剂的正常使用以及抑制样本的出现, 避免假阴性结果; 对于阳性检测样本, 人类免疫缺陷病毒内标的扩增信号可不予考虑。

7. 由于人类免疫缺陷病毒为 RNA 病毒, 操作过程中应特别注意防止 RNase 对 RNA 的降解作用, 所有使用的器皿、加样枪等均为专用, 离心管、PCR 管、吸嘴一次性耗材等均为无 RNA 酶污染。

【参考文献】

[1] Paraskevis D, Hatzakis A. Global molecular epidemiology of HIV-1: the chameleon challenge.. Lancet Infect Dis. 2019;19(2):114-115.

[2] Noorbazargan H, Nadjai SA, Samiee SM, et al. New design, development, and optimization of an in-house quantitative TaqMan Real-time PCR assay for HIV-1 viral load measurement. HIV Clin Trials. 2018;19(2):61-68.

[3] Kaur P, Khong WX, Wee SY, et al. Clinical evaluation of a low cost, in-house developed real-time RT-PCR human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) quantitation assay for HIV-1 infected patients. PLoS One. 2014; 9(3):e89826.

[4] 中华医学会: 中国艾滋病诊疗指南 (2018 年版)。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 圣湘生物科技股份有限公司

住所: 长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

联系方式: 0731-88883176 传真号码: 0731-88884876

售后服务单位名称: 圣湘生物科技股份有限公司

联系方式: 0731-88883176 传真号码: 0731-88884876

生产地址: 长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

生产许可证编号: 湘食药监械生产许 20150036 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20223401175

【说明书核准日期及修改日期】2022 年 09 月 07 日