

丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)说明书

【产品名称】

通用名称：丙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】 24 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定性检测丙型肝炎病毒（HCV）RNA 核酸阳性的血清或血浆样本中的丙型肝炎病毒 1b、2a、3a、3b 和 6a 基因型。

大量临床、基础研究发现，不同基因型感染者在临床表现、肝病严重程度、抗病毒诊疗上均有差异。HCV RNA 基因分型结果有助于判定治疗的难易程度及制定抗病毒治疗的个体化方案。本试剂盒对 HCV RNA 阳性血清或血浆中 1b、2a、3a、3b 和 6a 型进行体外分型定性检测。帮助医疗专业人员了解病人的丙型肝炎病毒感染情况以及确定适当的治疗方法。

【检验原理】

本产品采用磁珠法提取血清或血浆样本中的 HCV RNA，分别利用 HCV 1b/2a/3a/3b/6a 型特异性引物及荧光探针，配以 RT-PCR 反应液，采用荧光 PCR 技术对 HCV 1b/2a/3a/3b/6a 型的特异性 RNA 核酸片段进行分型检测。

本产品设计了 HCV-1b 型检测体系、HCV-2a/6a 型检测体系以及 HCV-3a/3b 型检测体系，在 Taq 酶的作用下对靶区域进行扩增，同时利用 Taqman 荧光探针技术实时监测扩增产物的累积。同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

【主要组成成分】

本试剂盒包括磁珠法核酸提取试剂和扩增反应试剂，由以下两个试剂包装组成：

包装盒	序号	试剂盒组成	主要成分
核酸提取试剂	1	核酸助沉剂	核酸助沉剂
	2	磁珠	磁珠
	3	蛋白酶 K	蛋白酶 K
	4	RNA 提取液 1	氯化钠、乙二醇四乙酸、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、十二烷基硫酸钠、异硫氰酸胍
	5	RNA 提取液 2	β-巯基乙醇、氯化钠
	6	RNA 提取液 3	氯化钠、三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、无水乙醇

扩增反应试剂	7	RNA 提取液 4	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液
	8	RNA 提取液 5	三羟甲基氨基甲烷-盐酸缓冲液、乙二醇四乙酸
	1	HCV 1b 型 PCR 反应液	反转录酶、尿嘧啶-N-糖基化酶、TaqDNA 聚合酶、
	2	HCV 2a/6a 型 PCR 反应液	脱氧核糖核苷三磷酸、氯化镁、内标引物、探针及
	3	HCV 3a/3b 型 PCR 反应液	各自反应液中本体体系型引物、探针
	4	HCV 内标	质粒
	5	HCV 阴性对照品	已灭活阴性样本
	6	HCV 1b 型阳性对照品	已灭活 HCV 1b 阳性样本
	7	HCV 1b 型弱阳性对照品	已灭活 HCV 1b 阳性样本
	8	HCV 2a/6a 型阳性对照品	已灭活 HCV 2a/6a 阳性样本
	9	HCV 2a/6a 型弱阳性对照	已灭活 HCV 2a/6a 阳性样本
	10	HCV 3a/3b 型阳性对照品	已灭活 HCV 3a/3b 阳性样本
	11	HCV 3a/3b 型弱阳性对照	已灭活 HCV 3a/3b 阳性样本

注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换。

注 2：试剂盒以外需要的设备及材料

荧光定量 PCR 仪、漩涡振荡器、生物安全柜、迷你离心机、干式恒温仪或水浴锅、移液器及灭菌的吸头（带过滤塞）、灭菌离心管、离心机、PCR 样品反应管、无粉乳胶手套、口罩和磁力架。

注 3：内标模板与靶基因无同源性。

注 4：蛋白酶 K 属于核酸提取组分，如需-20±5℃保存，放入扩增反应试剂盒。

【储存条件及有效期】

核酸提取试剂：2~8℃保存，扩增反应试剂：-20±5℃避光保存，试剂盒有效期为 8 个月。

试剂盒各组分反复冻融不宜超过三次，开瓶后请于一个月内使用。

生产日期及使用期限见包装标签。

【适用仪器】

ABI 7500、Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1.适用样本类型：血清或血浆样本。

2.样本采集：

2.1 血清样本采集：用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3~5mL，注入无菌收集管，室温放置不超过 4 小时，待样本自行析出血清或直接室温 1200rpm 离心 5 分钟分离出血清，转移到 1.5mL 灭

菌离心管中备用。

2.2 血浆样本采集：用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3~5mL，注入含有 EDTA 或枸橼酸钠的无菌收集管，立即轻轻颠倒混匀，室温 1200rpm 离心 5 分钟分离出血浆，转移到 1.5mL 灭菌离心管中备用。注：肝素可能会抑制 PCR 反应，本试剂盒不适用于含有肝素的血浆样本的检测。

3.样本保存和运送：

经上述处理后的待测样本可在 2~8℃ 保存 72 小时，-20±5℃ 保存 3 个月，长期保存请置于 -70℃ 以下；避免反复冻融（建议不超过 10 次）；样品运输请采用不易碎的容器(如冰壶或泡沫箱)加冰袋密封运输；样本应视作潜在传染源，在使用、保存及运输过程中避免外漏。

【检验方法】

1.试剂配制

1.1 取出各组分试剂，室温放置，待温度与室温平衡后混匀备用。

1.2 蛋白酶 K-mix 配制比例：蛋白酶 K 为 60μL/人份，核酸助沉剂 4μL/人份，HCV 内标 1μL/人份；以上比例为配制 1 人份蛋白酶 K-mix 试剂比例，进行一次检测至少配制人份量为：HCV 1b 型阳性、弱阳性对照品（各 1 份）+HCV 2a/6a 型阳性、弱阳性对照品（各 1 份）+HCV 3a/3b 型阳性、弱阳性对照品（各 1 份）、阴性对照品（1 份）+待测样本量；蛋白酶 K-mix 瞬时离心后备用。

2.样本处理

2.1 阳性对照品、阴性对照品需与待测样本同步处理。

2.2 取足量 1.5mL 灭菌离心管，标记好 HCV 1b 型阳性、弱阳性对照品（各 1 份）+HCV 2a/6a 型阳性、弱阳性对照品（各 1 份）+HCV 3a/3b 型阳性、弱阳性对照品（各 1 份）、阴性对照品（1 份）+待测样本，每管加入 300μL RNA 提取液 1，65μL 蛋白酶 K-mix。

2.3 每管对应加入 200μL 的 HCV 1b 型阳性及弱阳性对照品、HCV 2a/6a 型阳性及弱阳性对照品、HCV 3a/3b 型阳性及弱阳性对照品、HCV 阴性对照品、待测样本，每管加入 20μL 磁珠（使用前充分振荡混匀）及 100μL 提取液 2，盖紧管盖，震荡混匀 30 秒；室温颠倒混匀 15 分钟，使磁珠和核酸充分结合。

2.4 将离心管放在磁力架上静置 2 分钟，待磁珠吸附完全、溶液澄清后吸去上清液。

2.5 加入 550μL RNA 提取液 3，震荡混匀 5 秒，瞬时离心，置于磁力架上静置 2 分钟，缓慢吸去上清液。

2.6 重复操作 2.5。

2.7 将离心管放置在磁力架上，缓慢加入 600μL RNA 提取液 4，震荡混匀 5 秒，瞬时离心，置于磁力架上静置 2 分钟，缓慢吸去上清液，在磁力架上静置 1 分钟，吸去残液。

2.8 加入 50μL RNA 提取液 5，用移液器缓慢吹打混匀，55℃ 温浴 10 分钟，期间轻轻颠倒混匀四次。

2.9 将离心管放在磁力架上静置 2 分钟，将上清液转移至新标记好的灭菌离心管中。

3.加样

取 HCV 1b 型 PCR 反应液、HCV 2a/6a 型 PCR 反应液、HCV 3a/3b 型 PCR 反应液各 35μL 分别置于 PCR 反应管，然后将 HCV 1b 型阳性、弱阳性及阴性对照品、待测样本的处理上清液各 15μL，HCV 2a/6a 型阳性、弱阳性及阴性对照品、待测样本的处理上清液各 15μL，HCV 3a/3b 型阳性、弱阳性及阴性对照品、待测样本的处理上清液各 15μL 加入对应 PCR 反应管中，盖紧管盖（避免气泡产生），瞬时离心将管壁上的液体全部甩至管底，然后立即进行实时荧光 PCR 反应。

4.PCR 扩增程序设置

4.1 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) HCV-1b、3a、6a 亚型选 FAM 通道，HCV-2a、3b 亚型选 VIC 通道，内标为 CY5 通道。
- 3) 反应条件设置

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	RNA 反转录反应	50℃	30 分钟	1
2	预变性	95℃	3 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40
4	退火，延伸，及荧光采集	62℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

4.2 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪

- 1) 仪器操作请参照仪器说明书。
- 2) HCV-1b、3a、6a 亚型选 FAM 通道，HCV-2a、3b 亚型选 HEX 通道，内标为 CY5 通道。
- 3) 反应条件设置：

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	RNA 反转录反应	50℃	30 分钟	1
2	预变性	95℃	3 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	40

4	退火，延伸，及荧光采集	62℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

5. 结果分析条件的设定

反应结束后自动保存结果，对各亚型的曲线和相应内标的曲线进行分别分析。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 值可以设在 3~15、End 值可以设在 5~20，调整阴性质控品的扩增曲线低于阈值线或参照内标阈值线），点击 Analyze 进行分析，然后到 Plate 窗口下记录扩增结果。

6. 质量控制

6.1 内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.2 HCV 阴性对照品的靶基因 FAM 和 HEX（VIC）通道均无 Ct 值；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.3 HCV 1b 型阳性对照品在 HCV 1b 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤30，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.4 HCV 1b 型弱阳性对照品在 HCV 1b 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤36，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.5 HCV 2a/6a 型阳性对照品在 HCV 2a/6a 型 PCR 反应液的 FAM 和 HEX（VIC）通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤30，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.6 HCV 2a/6a 型弱阳性对照品在 HCV 2a/6a 型 PCR 反应液的 FAM 和 HEX（VIC）通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤36，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.7 HCV 3a/3b 型阳性对照品在 HCV 3a/3b 型 PCR 反应液的 FAM 和 HEX（VIC）通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤30，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.8 HCV 3a/3b 型弱阳性对照品在 HCV 3a/3b 型 PCR 反应液的 FAM 和 HEX（VIC）通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤36，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

6.9 以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值或者参考区间】

本试剂盒的阳性样本参考值为 Ct 值≤36；阴性样本无 Ct 值；HCV 内标检测为阳性且 Ct 值≤28；36<Ct 值≤40 为灰区。

【检验结果的解释】

1. 若内标通道没有出现 S 型扩增曲线，或内标通道虽出现 S 型扩增曲线，但 Ct 值>28，检测结果无效，应重新提取样本核酸进行检测。

2. 若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28，同时靶基因 FAM 或者 HEX（VIC）通道均无 S 型扩增曲线，则待检样本为 HCV 1b/2a/3a/3b 和 6a 型的阴性。

3. 若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28，同时靶基因 FAM 或者 HEX（VIC）通道有 S 型扩增曲线，则有如下解释：

3.1 若待检样本在 HCV 1b 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HCV 1b 型阳性；

3.2 若待检样本在 HCV 2a/6a 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HCV 6a 型阳性；

3.3 若待检样本在 HCV 2a/6a 型 PCR 反应液的 HEX(VIC)通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HCV 2a 型阳性；

3.4 若待检样本在 HCV 3a/3b 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HCV 3a 型阳性；

3.5 若待检样本在 HCV 3a/3b 型 PCR 反应液的 HEX(VIC)通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HCV 3b 型阳性；

3.6 若待测样本检测结果某两个亚型反应体系均有扩增曲线，且 Ct 值均≤36，相应阴性对照均为阴性，排除交叉污染的可能性，则可判断该样本可能为混合感染。

3.7 若待检样本 Ct 值在 36~40 之间，并且扩增曲线正常，需重新提取样本核酸进行检测，若重复检测 Ct 值<40，HCV-1b 体系 FAM 通道为 1b 亚型，HCV-2a/6a 体系 FAM 通道为 6a 亚型，HEX(VIC)通道为 2a 亚型，HCV-3a/3b 体系 FAM 通道为 3a 亚型，HEX(VIC)通道为 3b 亚型。

3.8 若靶基因 Ct 值≤15 而又出现不规则曲线，应重新提取样本核酸稀释后进行检测，具体方法见本说明书的样本处理。

【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、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

2. 本试剂盒仅用于丙型肝炎病毒核酸检测阳性患者的临床样本检测。

3. 本试剂盒仅用于不同基因型的定性检测，不适用定量检测。

4.本试剂盒只能检测丙肝病毒基因 1b/2a/3a/3b/6a 基因型，对其它基因型不能做进一步分析。

5.当待测样本 HCV RNA 含量低于最低检测限 1×10^3 IU/mL 时可能会检测不到，表现为假阴性的结果；模板 RNA 的质量可能受样本来源、采集过程、运输条件、样本处理等因素影响，同时也受提取方法、PCR 仪类型、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等的限制，可能导致出现假阳性和假阴性的检测结果；使用者需了解检测过程中可能存在的潜在风险。

【产品性能指标】

- 1.最低检测限： 1×10^3 IU/mL。
- 2.精密度：将精密度参考品 1b-E1、1b-E2，2a/6a-E1、2a/6a-E2，3a/3b-E1、3a/3b-E2 各测定 8 次，Ct 值的检测结果 $CV \leq 5\%$ （ $n=8$ ）。
- 3.分析特异性：
- 3.1 交叉反应
- 本试剂盒与甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、梅毒、人巨细胞病毒、E-B 病毒、疱疹类病毒均无交叉反应。
- 3.2 干扰物质
- 样本中常见干扰物质高浓度的胆红素($50 \mu\text{mol/L}$)、甘油三酯(1.7mmol/L)、血红蛋白(200g/L)、EDTA (2.5mg/mL) 对试剂盒的检测结果没有影响。
- 3.3 临床试验情况
- 通过在三家临床医院，使用本产品与同类已上市产品进行对比试验，考核试剂检测结果与参比试剂检测结果一致，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%，Kappa 为 1。
- 4.阳性参考品符合率：国家阳性参考品 1b、2a、3a、6a 分型样本检测结果不得出现假阴性，符合率 4/4；企业阳性参考品检测结果不得出现假阴性，符合率 12/12。
- 5.阴性参考品符合率：企业阴性参考品检测结果不得出现假阳性，符合率 8/8。
- 6.最低检出限：国家最低检出限参考品 1b、2a、3a、6a 分型样本检测结果应为阳性，且 Ct 值 ≤ 36 ；企业最低检出限参考品(L-1b)、(L-2a/6a) 及 (L-3a/3b) 检测结果应为阳性，且 Ct 值 ≤ 36 。

【注意事项】

- 1.本产品仅用于体外诊断。
- 2.使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。
- 3.操作人员应经过以下专业培训，具有合格的操作技能方能上岗。

- 4.请自备移液器，振荡器，迷你离心机，离心机，干式恒温仪或水浴锅，无菌吸头、离心管，PCR 反应管及无粉一次性乳胶手套（经常更换）。
- 5.样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。
- 6.样本操作和处理需符合相关法规要求：卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 7.实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。
- 8.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替换手套以避免样品间的交叉污染。
- 9.实验完毕后使用 5%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪表面，然后紫外灯照射 25~30 分钟。
- 10.不同批号试剂盒中各组分不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒。不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断医疗器械
	查阅使用说明

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

联系方式：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系方式：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

生产许可证编号：京食药监械生产许 20120027 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20173403221

【说明书核准及修改日期】

核准日期：2017 年 06 月 08 日 修改日期：2022 年 06 月 08 日