

【产品名称】

通用名称：丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装，48 人份/盒；
单管单人份，48 人份/盒；
单管单人份，24 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人血清或血浆样本中的丙型肝炎病毒 RNA。

丙型肝炎病毒(hepatitis C virus, HCV)是一种全球性传染的病原体，可引起急、慢性病毒性肝炎，慢性肝炎迁延不愈，可导致肝脏慢性炎症坏死和纤维化，部分患者可发展为肝硬化甚至肝细胞癌，对患者的健康和生命危害极大，已成为严重的社会和公共卫生问题。丙型肝炎的感染呈世界性分布，据世界卫生组织统计，全球 HCV 的感染率约为 3%，每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例。HCV 属于黄病毒科(flaviviridae)，为单股正链 RNA 病毒，其基因组包括 9,400 左右个核苷酸，易变异。可分为 6 个基因型及不同亚型，中国的主要流行型是基因 1b 型和 2a 型。在 HCV 急性感染期，在血浆或血清中的病毒基因组水平可达到 $10^5 \sim 10^7$ 拷贝/mL。在 HCV 慢性感染者中，HCV RNA 水平在不同个体之间存在很大差异，变化范围在 $5 \times 10^4 \sim 5 \times 10^6$ 拷贝/mL 之间，但同一名患者的血液中 HCV RNA 水平相对稳定。

检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。本试剂盒不用于血源筛查用途。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以丙型肝炎病毒基因编码区的高度保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，进行一步法 RT-PCR 扩增，用于血清或血浆标本中 HCV RNA 的定量检测。另外，本试剂盒还带有内标物质，用于对核酸提取的整个过程进行监控，减少假阴性结果的出现。

使用本试剂盒推荐的核酸提取试剂对临床样本进行处理和核酸提取，以试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制成 PCR 反应管，将提取的核酸加入 PCR 反应管中，使用荧光定量 PCR 仪进行一步法 RT-PCR 扩增，并检测荧光信号。仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线，根据阈循环值 (Ct 值) 实现对未知样本的定量检测。

【主要组成成分】

组分名称		规格	数量	主要成分
质控品 (适用于大包装规格、 单管单人份规格)	阴性质控品	600μL/管	1	阴性血浆
	HCV 强阳性质控品	600μL/管	1	含 HCV 目的片段的病毒样颗粒
	HCV 临界阳性质控品	600μL/管	1	含 HCV 目的片段的病毒样颗粒
	HCV 阳性定量参考品 1 (1.0×10^6 IU/mL)	600μL/管	1	含有 HCV 目的片段的病毒样颗粒
	HCV 阳性定量参考品 2 (1.0×10^5 IU/mL)	600μL/管	1	含有 HCV 目的片段的病毒样颗粒
	HCV 阳性定量参考品 3 (1.0×10^4 IU/mL)	600μL/管	1	含有 HCV 目的片段的病毒样颗粒
	HCV 阳性定量参考品 4 (1.0×10^3 IU/mL)	600μL/管	1	含有 HCV 目的片段的病毒样颗粒
PCR 检测试剂 (适用于大包装规格)	HCV 内标溶液	250μL/管	1	含内标片段的病毒样颗粒及稳定剂
	HCV 反应液 A	96μL/管	1	HCV 特异性的引物和探针
	HCV 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、RNasin、c-MMLV 酶
	HCV 反应液 C	720μL/管	1	MgCl ₂ 、Tris 盐酸 Buffer、Brij-58
PCR 检测试剂 (适用于单管单人 份, 48 人份/盒规格)	HCV 内标溶液	250μL/管	1	含内标片段的病毒样颗粒及稳定剂
	HCV-PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	48	HCV 特异性的引物和探针、热启动 Taq 酶、RNasin、c-MMLV 酶
PCR 检测试剂 (适用于单管单人 份, 24 人份/盒规格)	HCV 内标溶液	125μL/管	1	内标病毒样颗粒及稳定剂
	HCV-PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	24	HCV 特异性的引物和探针、热启动 Taq 酶、RNasin、c-MMLV 酶

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂，推荐使用广州达安基因股份有限公司生产的粤穗械备 20181277 号。

【储存条件和有效期】

本试剂盒于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 保存，有效期 9 个月。

避免反复冻融，冻融次数不超过 4 次；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不应超过 8 小时；运输采用干冰（或者冰袋）保持低温，运输时间不应超过 4 天。

本试剂盒生产日期和失效日期见产品包装标签。

【适用仪器】ABI Prism 7300, ABI Prism 7500, LightCycler480, Abbott m2000 system。

【样本要求】

- 1. 适用标本类型：血清或血浆。
- 2. 标本采集：
 - 2.1 血清 — 用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 毫升，注入无菌的干燥玻璃管，室温（22~25℃）放置 30~60 分钟，血标本可自发完全凝集析出血清，或直接使用水平离心机，1500 rpm 离心 5 分钟；吸取上层血清，转移至 1.5mL 灭菌离心管。
 - 2.2 血浆 — 用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 毫升，注入含 EDTA-2Na（乙二胺四乙酸二钠）或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血充分混匀，5~10 分钟 后即可分离出血浆，转移至 1.5mL 灭菌离心管。
- 3. 标本保存和运送：所采集的标本可立即用于测试或长期保存于-70℃，也可以保存于-20℃待测，保存期为 3 个月，标本应避免反复冻融。标本运送采用 0℃冰壶。

【检验方法】

1 样本处理和核酸提取（样本处理区）

样本处理和核酸提取可采用广州达安基因股份有限公司生产的核酸提取或纯化试剂，本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，若提取试剂盒中无说明内标的使用方法，则可按照样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例在样本中加入内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的阴性质控品和阳性质控品均需要提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。

2 PCR 试剂准备（试剂准备区）

大包装：

2.1 ABI Prism 7300, ABI Prism 7500, LightCycler480:

从试剂盒中取出 HCV 反应液 A、HCV 反应液 B、HCV 反应液 C，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+HCV 强阳性质控品+HCV 临界阳性质控品+4 管 HCV 阳性定量参考品）PCR 反应管，HCV 单人份扩增体系配制如下表：

组分	HCV 反应液 A	HCV 反应液 B	HCV 反应液 C	总体积
用量	2μL	3μL	15μL	20μL

将各组充分混合，混合好后进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底，之后将 20μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

2.2 Abbott m2000 system:

从试剂盒中取出 HCV 反应液 A、HCV 反应液 B、HCV 反应液 C，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

按比例取 PCR 试剂组分到 4mL MasterMix 管中混合，充分混匀后打开螺口管盖，放置在 Abbott m2000 sp 中，同时将 PCR 扩增板放入 Abbott m2000 sp 中，选择相应的程序，运行。程序运行完毕后，封好热盖膜，3,000rpm 离心数秒，备用。

单管单人份：直接使用 HCV-PCR 反应管。

3 加样（样本制备区）

往上述 HCV 反应管中用带滤芯吸嘴分别加入提取后的待测样本核酸、HCV 阴性质控品、HCV 强阳性质控品、HCV 临界阳性质控品和 HCV 阳性定量参考品 40μL。盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4 PCR 扩增（扩增和产物分析区）

- 4.1 将反应管放入仪器样品槽内。
- 4.2 ABI Prism 7500 仪器设置（ABI Prism 7300 仪器设置参照此操作）
 - 4.2.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknown）、阳性定量参考品（Standard），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: TAMRA, Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: none, Passive Reference: NONE。
 - 4.2.2 打开instrument窗口，设置循环条件如下：
 - 50℃ 15分钟，1个循环；
 - 95℃ 15分钟，1个循环；
 - 94℃ 15秒→55℃ 45秒（收集荧光），45个循环。设置完成后，保存文件，运行程序。
- 4.3 LightCycler480 仪器设置
 - 4.3.1 点击软件主界面的“New Experiment”，进入程序设定界面。
 - 4.3.2 检测模式设置：从Detection Format的下拉框中选择分析模式：Multi Color Hydrolysis Probe，“Customizes”模块中选择FAM(483-533)和VIC(523-568)滤片组合，“Block Type”为仪器自动检测，“Plate ID”可手工输入或扫描仪扫描，“Reaction Volume”设定为60 μl。
 - 4.3.3 循环参数：定义 PCR 程序中每个步骤（Program Name）及循环数(Cycles)和分析模式(Analysis Mode)，利用“+”和“-”增加或删除步骤，扩增参数如下：
 - 50℃ 15分钟，1个循环；
 - 95℃ 15分钟，1个循环；
 - 94℃ 15秒→55℃ 45秒，45个循环；（此步采集荧光信号：“Analysis Mode”选择“Quantification”，“Acquisition Mode”选择“Single”）；40℃ 2秒，1个循环；
 - 4.3.4 填样品表：点击“Sample Editor”模块，进入样本信息编辑界面，在“Select Workflow”中选择“Abs Quant”，在“Sample Name”列中定义样本名称，在“Sample Type”栏中选定样品类型：阴性质控品选NTC；未知样品选Unknown；标准品选Standard，并在“Concentration”栏中输入标准品浓度。

4.3.5 运行程序：点击“Experiment”模块，回到程序设定界面，点击窗口右下方的“Start Run”，弹出结果保存窗口，输入文件名和路径后进入程序运行界面。

4.4 Abbott m2000 rt仪器设置

4.4.1 将带有protocol的CD光盘载入system计算机，安装扩增程序，在Abbott m2000 rt中选择相应的扩增指令，将加完核酸的PCR反应管放入仪器样品槽，关闭仪器舱门，运行扩增程序。

5 结果分析

反应结束后自动保存结果，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，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使阈值线位于扩增曲线指数期，阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果，在 Report 界面察看结果，记录未知样本数值（C）。

6 质量控制

阴性质控品：FAM 检测通路扩增曲线无对数增长期，VIC 检测通路扩增曲线为对数增长期；

HCV 阳性质控品：FAM 检测通路扩增曲线有明显对数增长期，呈典型 S 型扩增曲线，且强阳性和临界阳性质控品的定值分别在 1.0×10^5 ~ 5.0×10^6 IU/mL 和 1.0×10^2 ~ 1.0×10^4 IU/mL 范围内。

HCV 阳性定量参考品：FAM 检测通路扩增曲线有明显对数增长期，呈典型 S 型曲线，Ct 值 <40，且 $R^2 \geq 0.97$ ；

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。

7 结果判断

7.1 如果 FAM 检测通道无对数增长期，且在 VIC 检测通道有对数增长期，则判样品的 HCV RNA 浓度小于检测灵敏度。

7.2 如果在 FAM 检测通道扩增曲线有对数增长期且 Ct 值小于 45，则按以下方法判断：

若样品的 $5.00E+001 \leq C \leq 1.00E+008$ ，则该样品的 HCV RNA 浓度 = C IU/mL；

若样品的 $C > 1.00E+008$ ，则该样品的 HCV RNA 浓度 $> 1 \times 10^8$ IU/mL。如果需要精确定量结果，可将样品用阴性质控品稀释到线性范围后再检测。则该样品的 HCV RNA 浓度 = (C × 稀释倍数) IU/mL；

若样品的 $2.00E+001 \leq C < 5.00E+001$ ，则该样品的 HCV RNA 浓度仅作参考；

若样品的 $C < 2.00E+001$ ，同时 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长期，则该样品的 HCV RNA 浓度低于试剂盒的检测下限。

【参考区间】 根据临床样本的检测结果，确定本试剂盒的阳性判断值为：Ct 值为 45。

【检验结果的解释】

1 每次实验均需检测阴性质控品，HCV 强阳性质控品，HCV 临界阳性质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。

2 阳性结果判定标准：扩增曲线在 FAM, VIC 检测通道均有对数增长期；或扩增曲线在 FAM 检测通道有对数增长期，在 VIC 检测通道无对数增长期。

3 阴性结果判定标准：扩增曲线在 FAM 检测通道无明显对数增长期，在 VIC 检测通道有对数增长期。

4 报告建议采用以下格式：

阴性结果报告格式为：样本未检测到丙型肝炎病毒 RNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；

阳性结果报告格式为：

1) 当样本试验结果 HCV RNA 浓度在 $50 \text{ IU/mL} \leq C \leq 1.00E+008 \text{ IU/mL}$ 时，报告格式为：样本检测到丙型肝炎病毒 RNA，其浓度为 C IU/mL；

2) 当样本试验结果 HCV RNA 浓度在 $20 \text{ IU/mL} \leq C < 50 \text{ IU/mL}$ 时，报告格式为：报告格式为：样本的丙型肝炎病毒 RNA 载量较低，测量值仅供参考；

3) 当样本的试验结果 HCV RNA 浓度 $C > 1.00E+008$ 时，报告格式为：样本检测检测到丙型肝炎病毒 RNA，其浓度大于 $1 \times 10^8 \text{ IU/mL}$ ，如经稀释后检测，则报告格式为：样本检测到丙型肝炎病毒 RNA，浓度为 (C × 稀释倍数) IU/mL。

4) 当样本的试验结果 HCV RNA 浓度 $C < 20 \text{ IU/mL}$ ，同时 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长期，报告格式为：样本的丙型肝炎病毒 RNA 含量低于试剂盒的检测下限；若内标检测通道扩增曲线无对数增长期或无 Ct 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检测（若结果仍为无效，请与本公司联系）。

5 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【检验方法的局限性】

1. 样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关；

2. 样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果；

3. 病毒在流行过程中的基因突变则也可能导致假阴性结果；

4. 由于不同提取方法的原理不同，采用不同核酸提取试剂进行样本处理时核酸提取效率存在一定差异，用户可根据具体要求进行选择确认；

5. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【产品性能指标】

1、本试剂盒的灵敏度为 20 IU/mL ，线性范围为 $5.0 \times 10^1 \text{ IU/mL} \sim 1.0 \times 10^8 \text{ IU/mL}$ 。

2、分析特异性：

a 与感染部位相同或感染病状相似的病毒或其他病毒（黄病毒科如：西尼罗病毒等，登革热病毒（DV），人巨细胞病毒（HCMV），EB 病毒（EBV），人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1），人类免疫缺陷病毒 2 型（HIV-2），乙型肝炎病毒（HBV），甲型肝炎病毒（HAV），梅毒螺旋体（TP），人类疱疹病毒 6 型（HSV-6），单纯疱疹病毒 1 型（HSV-1），单纯疱疹病毒 2 型（HSV-2），甲型流感病毒，金黄色葡萄球菌，白色念珠菌）均无交叉反应。

b 浓度不大于 30 mg/dL 的胆红素，不大于 3000 mg/dL 的甘油三酯，不大于 28 g/dL 的血红蛋白，不大于 6 g/dL 的白蛋白。在本

试剂盒的实验条件下，对丙型肝炎病毒样本检测结果无干扰。

3、批内和批间精密度检测定量值对数的 CV% 小于 5%。

【注意事项】

- 1 本品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书。
- 2 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理建议在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和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》；
- 3 试剂盒中组分需在有效期内使用，不使用本试剂盒提供的组分进行实验将可能导致错误结果。
- 4 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（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），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。
- 5 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头。
- 6 PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融。
- 7 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于-20℃待用（24h 内）。
- 8 如果在标本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性。
- 9 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。
- 10 对每次实验进行质量控制。
- 11 实验完毕用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20—30 分钟。
- 12 本试剂盒内的阳性质控品和检测样本均应视为具有传染性物质，因此标本操作和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》。

【参考文献】

- 1 Lozano R, Naghavi M, Foreman K, Lim S, Shibuya K, Aboyans V, Abraham J, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. Lancet 2012;380:2095-2128.
- 2 Strassl R, Rutter K, Stättermayer AF, Beinhardt S, Kammer M, Hofer H, Ferenci P, Popow-Kraupp T. Real-Time PCR Assays for the Quantification of HCV RNA: Concordance, Discrepancies and Implications for Response Guided Therapy. PLoS One. 2015 Aug 14;10(8):e0135963.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820

电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820

电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665

网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；

广州高新技术产业开发区荔枝山路 6 号；

广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房。

生产许可证编号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书批准日期及修改日期】