

【产品名称】

通用名称：人类免疫缺陷病毒 1 型（HIV-1）核酸测定试剂盒（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。

【预期用途】

本产品用于体外定量检测人血清或血浆样本中人类免疫缺陷病毒 1 型核酸 RNA 的含量。

人类免疫缺陷病毒（human immunodeficiency virus, HIV）是获得性免疫缺陷综合征（acquired immunodeficiency syndrome, AIDS）的病原体。联合国艾滋病规划署公布的《2008 年全球艾滋病流行状况报告》显示，2008 年全球大约有 3340 万艾滋病病毒感染者，270 万新发感染者，200 万人死于艾滋病。其中，大约有 43 万新生儿感染艾滋病病毒，15 岁以下儿童艾滋病病毒感染者总数达到 210 万；年轻人占所有成年人（15 岁以上）新发感染的 40%。即使是随着医学技术等发展使艾滋病传播得到有效控制，但目前该病尚无法治愈，也无有效疫苗。因此，HIV 感染的实验室诊断是艾滋病预防控制工作的重要组成部分，只有发现传染源才能更有效地控制艾滋病传播。早期检测出 HIV 的感染对相关疾病的治疗和预后有着重要的意义。HIV 的基因结构与其它逆转录病毒基本相同，为 RNA 双分子，由 2 条相同的正股 RNA 链在 5' 端通过部分碱基互补配对而形成双聚体。病毒基因组由 9749 个核苷酸组成，含有 3 组共 9 个基因（gag、pol、env、tat、rev、nef、vif、vpr 和 vpr）。

本试剂盒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】

本试剂盒利用荧光 PCR 技术，以 HIV 基因中相对保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，在样本核酸纯化之后，通过一步法 RT-PCR 对 HIV-1 RNA 进行快速定量检测。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 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，根据阈值循环值（CT 值）实现对未知样本的定量检测。

【主要组成成分】

试剂盒中包含的试剂组分

组分名称		规格	数量	主要成分
PCR 检测试剂 (适用于大包装规格)	HIV-1 内标溶液	250μL/管	1	含有内标片段的病毒样颗粒及稳定剂
	HIV-1 反应液 A	96μL/管	1	HIV-1 特异性的引物和探针
	HIV-1 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、逆转录酶
	HIV-1 反应液 C	1.2mL/管	1	MgCl ₂ 、Tris 盐酸 Buffer
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份规格)	HIV-1 内标溶液	250μL/管	1	含有内标片段的病毒样颗粒及稳定剂
	HIV-1 PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	48	HIV-1 特异性的引物和探针、热启动 Taq 酶、逆转录酶、RNasin
质控品及阳性定量参考品 (适用于大包装规格、单管单人份规格)	阴性质控品	400μL/管	1	阴性血浆
	HIV-1 强阳性质控品	400μL/管	1	含有 HIV-1 目的片段的病毒样颗粒
	HIV-1 临界阳性质控品	400μL/管	1	含有 HIV-1 目的片段的病毒样颗粒
	HIV-1 阳性定量参考品 1(1.0×10 ⁷ IU/mL)	200μL/管	1	含有 HIV-1 目的片段的重组质粒
	HIV-1 阳性定量参考品 2(1.0×10 ⁶ IU/mL)	200μL/管	1	含有 HIV-1 目的片段的重组质粒
	HIV-1 阳性定量参考品 3(1.0×10 ⁵ IU/mL)	200μL/管	1	含有 HIV-1 目的片段的重组质粒
	HIV-1 阳性定量参考品 4(1.0×10 ⁴ IU/mL)	200μL/管	1	含有 HIV-1 目的片段的重组质粒

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒有效期为 9 个月，PCR 检测试剂、质控品、阳性定量参考品组分保存于 -20±5℃。

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。

本试剂盒的生产日期与使用期限，详见本产品的包装标签。

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

【样本要求】

- 适用标本类型：血清或血浆。
- 标本采集：
 - 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。
 - 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。
- 标本保存和运送：所采集的标本可立即用于测试，-20℃ 保存期为 3 个月；-70℃ 以下长期保存，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（粤穗械备 20170583 号、粤穗械备 20170668 号、粤穗械备 20170669

号), 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、HIV-1 强阳性质控品、HIV-1 临界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)

大包装规格试剂适用:

从试剂盒中取出 HIV-1 反应液 A、HIV-1 反应液 B、HIV-1 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+HIV-1 强阳性质控品+HIV-1 临界阳性质控品+4 管 HIV-1 阳性定量参考品) PCR 反应管, HIV-1 单人份扩增体系配制如下表:

组分	HIV-1 反应液 A	HIV-1 反应液 B	HIV-1 反应液 C	总体积
用量	2μL	3μL	25μL	30μL

将各组分充分混合, 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 30μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

单管单人份规格试剂适用:

直接使用 HIV-1 PCR 反应管。

3. 加样 (样本制备区)

往上述 HIV-1 反应管中用带滤芯吸嘴分别加入提取后的待测样本核酸、阴性质控品、HIV-1 强阳性质控品、HIV-1 临界阳性质控品和直接加入 HIV-1 阳性定量参考品 20μL。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 仪器参照此操作, 具体操作见说明书)

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 (具体操作见说明书)

4.3.1 新建文件: 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 50μL。

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”)
- 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。

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, 使基线位于扩增曲线指数期, 调整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;
- HIV-1 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 HIV-1 强阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^6 \sim 2.0 \times 10^7$ IU/mL; HIV-1 临界阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^4$ IU/mL;
- HIV-1 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 < 37, 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 HIV-1 RNA 浓度小于检测灵敏度。
- 7.2 如果 FAM 荧光信号增幅明显, 扩增曲线有明显对数增长期, 呈典型 S 型曲线, 且 Ct 值 < 45, 则按以下方法判断:
 - 若样品的 $2.50E+002 \leq C \leq 1.00E+008$, 则该样品的 HIV-1 RNA 浓度 = C IU/mL;
 - 若样品的 $C > 1.00E+008$, 则该样品的 HIV-1 RNA 浓度 $> 1.0 \times 10^8$ 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 HIV-1 RNA 浓度 = (C × 稀释倍数) IU/mL;
 - 若样品的 $C < 2.50E+002$, 则该样品的 HIV-1 RNA 浓度 $< 2.5 \times 10^2$ IU/mL。

【参考区间】

根据临床样本的检测结果, 确定本试剂盒的参考值为 Ct 值等于 45。

【检验结果的解释】

- 1. 每次实验均需检测阴性质控品, HIV-1 强阳性质控品, HIV-1 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: 样本未检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA, 浓度低于试剂盒的灵敏度;

阳性结果报告格式为：

- 1) 当样本的试验结果 HIV-1 RNA 浓度 $C < 2.50E+002$ ，报告格式为：样本检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA，浓度小于 2.5×10^2 IU/mL，表明病毒载量较低，该拷贝数仅供参考，建议随访；
- 2) 当样本试验结果 HIV-1 RNA 浓度在 $2.50E+002 \leq C \leq 1.00E+008$ 时，报告格式为：样本检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA，其浓度为 C IU/mL；
- 3) 当样本的试验结果 HIV-1 RNA 浓度 $C > 1.00E+008$ 时，报告格式为：样本检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA 浓度大于 1.0×10^8 IU/mL，如经稀释后检测，则报告格式为：样本检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA，浓度为（C × 稀释倍数）IU/mL。
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。
6. 示例：

样本 1 和 2 使用本试剂盒进行检测，上机图及定量结果见图 1、图 2 和表 1。图 1 包括阳性定量参考品 1-4、阴性质控品、阳性质控品，待检测样本 1 和 2（箭头所指为待检样本扩增曲线）。

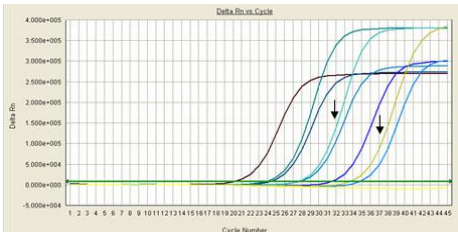


图 1 扩增图

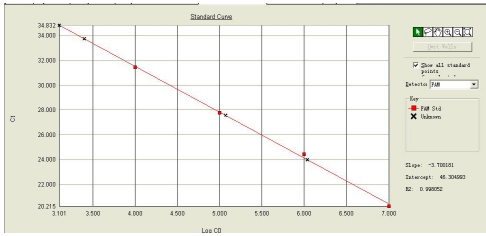


图 2 标准曲线

表 1 检测结果

Sample Name	Detector	Task	Ct	StdDev Ct	Quantity
HIV-S1	FAM	Standard	20.2149		1.0e+007
HIV-S2	FAM	Standard	24.4053		1.0e+006
HIV-S3	FAM	Standard	27.7678		1.0e+005
HIV-S4	FAM	Standard	31.428		1.0e+004
强阳性质控品	FAM	Unknown	23.9667		1.08916e+006
临界阳性质控品	FAM	Unknown	34.8319		1.26093e+003
样本1	FAM	Unknown	27.5451		1.1749e+005
样本2	FAM	Unknown	33.7391		2.48899e+003
阴性质控品	FAM	NTC	Undet.		

从以上图表可知，标准曲线的相关系数为 0.998，HIV-1 强阳性质控品、HIV-1 临界阳性质控品和阴性质控品均满足试剂盒要求，可以进行结果判定。由表 1 知，样本 1 的定量值 1.17×10^5 IU/mL，样本 2 的定量值 2.49×10^3 IU/mL。

报告格式为：样本 1 检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA，其浓度为 1.17×10^5 IU/mL；样本 2 检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA，其浓度为 2.49×10^3 IU/mL。

【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；
- 按照上述步骤本试剂盒的灵敏度为 100IU/mL，如需要对更低病毒滴度的样本进行检测，可使用大包装试剂，按以下的超敏步骤进行检测，灵敏度可达到 50IU/mL。

1. 实验前准备

每管 Carrier RNA（干粉）中各加入 110μL 的洗脱液，充分混匀，溶解。-20℃ 保存（Carrier RNA 为白色或半透明物质，请仔细检查，确保其完全溶解）。其余试剂准备同前，见【检验方法】。

2. 核酸提取（样本制备区）

- 2.1 分别在 3 个 1.5mL 的无菌离心管内加入 50μL 的蛋白酶 K；
- 2.2 同一样本各取 200μL 加入至上述 3 个离心管中；
- 2.3 在 3 离心管中各加入 200μL 的裂解工作液（即已含 Carrier RNA 的病毒裂解液），盖紧管盖，漩涡振荡 15 秒以充分混匀，高速离心 10 秒（防止温育时产生气泡），72℃ 10 分钟。同时可将洗脱液置于 72℃ 预热；
- 2.4 再加入 250μL 无水乙醇，盖紧管盖，振荡 15 秒；
- 2.5 将其中一管混合液（700μL）全部吸至离心柱，室温下 12,000rpm 离心 1 分钟，将离心柱装回至原收集管；再分别将剩余 2 管混合液按该步骤进行过柱离心处理，最后将离心柱装至新收集管；

后续步骤按【检验方法】新下进行。

3. PCR 试剂准备和加样步骤同前，见【检验方法】。

4. PCR 扩增

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），55个循环。
其余同前。

5. 结果分析步骤同前。

6. 质量控制

阴性质控品：FAM 检测通路扩增曲线无对数增长长期；
其余同前。

7. 结果判断

- 7.1 如果 FAM 检测通道无对数增长长期，则判样品未检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA，HIV-1 RNA 浓度小于 50IU/mL。
- 7.2 如果 FAM 荧光信号增幅明显，扩增曲线有明显对数增长长期，呈典型 S 型曲线，且 Ct 值 < 55，则样本检测到人类免疫缺陷病毒 1 型 RNA。

【产品性能指标】

- 1、本试剂盒的灵敏度为 100IU/mL，线性范围为 250IU /mL~ 1.0×10^8 IU/mL。
- 2、分析特异性：

a 与感染部位相同或感染症状相似的病毒或其他病毒（丙型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、EB 病毒、腺病毒 2 型（AD2）、人类疱疹病毒（HHV）、单纯疱疹病毒 1 型（HSV1）、单纯疱疹病毒 2 型（HSV2））无交叉反应。

b 浓度不大于 30mg/dl 的胆红素，不大于 3200mg/dl 的甘油三酯，不大于 28g/dl 的血红蛋白，不大于 6g/dl 的白蛋白对试剂盒的检测无干扰。

3、批内和批间精密度指标均可达到 CV%小于 10%。

4、临床研究结果显示，本试剂盒与参比试剂盒的检测结果阳性符合率为 99.80%，阴性符合率为 97.76%，Kappa 检验一致性分析表明具有很好的一致性。

【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；样本的处理应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(24 小时内)。
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. Wei L, Yang H, Kimberly R, et al. 2005, Detection of human immunodeficiency virus type 1 RNA in dried blood spots by a duplex real-time PCR assay. J Clin Microbiol, 43 (4): 1851-1857.
2. Nathalie D, Axelle D, Veronique S, et al. 2001, Quantification of human immunodeficiency virus type 1 proviral load by a TaqMan real time PCR assay. 39 (4): 1303-1310.

【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>

售后和服务单位名称：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；广州市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】