

丙型肝炎病毒（HCV）基因分型 检测试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：丙型肝炎病毒（HCV）基因分型检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

10人份/盒、30人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于体外定性检测临床样本中的HCV 1b、2a、3a、3b和6a亚型及混合亚型核酸。

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。该产品用于对已经其他方法确诊的丙肝病毒核酸阳性的样本进行HCV基因分型（包括1b、2a、3a、3b和6a型）分析，不建议用于对未知样品中丙肝病毒核酸阴性或阳性的检测。

【检验原理】

本品选取HCV五种亚型的保守区域，设计相应的特异性引物和探针，运用一步法RT-PCR技术和Taqman 荧光探针技术，检测分成三管反应，在扩增HCV五种亚型保守基因的部分片段的同时，实时检测五种HCV亚型特异性探针的荧光信号。根据五种探针荧光信号的检测结果，可检测样品中是否含有HCV 1b、2a、3a、3b和6a亚型病毒核酸，从而判断样本是否为HCV 1b、2a、3a、3b和6a亚型单独感染或混合感染。

【主要组成成分】

组分名称	10人份/盒	30人份/盒	数量	主要成分
HCV 1b RT-PCR 反应液	380μL	1140μL	1管	引物、探针、dNTP、缓冲液体系等
HCV 2a/6a RT-PCR 反应液	380μL	1140μL	1管	引物、探针、dNTP、缓冲液体系等
HCV 3a/3b RT-PCR 反应液	380μL	1140μL	1管	引物、探针、dNTP、缓冲液体系等
RT-PCR 酶系	60μL	180μL	1管	M-MLV逆转录酶、RNase抑制剂、Taq DNA聚合酶
矿物油	750μL	2250μL	1管	矿物油
HCV分型阳性质控品	100μL	300μL	1管	经过灭活处理的HCV 1b 阳性感染者的血清样本
HCV分型阴性质控品	100μL	300μL	1管	经过灭活处理的HCV 阴性血清样本

说明：1. 不同批号试剂盒中的组分不可以互换使用。

2. HCV分型阳性质控品来源于临床收集的HCV 1b阳性感染者的血清样本，适当稀释后所得的液体；HCV分型阴性质控品来源于临床收集的HCV阴性血清样本。以上质控品均经过灭活处理。

【储存条件及有效期】

-20±5℃保存，有效期8个月。

避免反复冻融。

本试剂盒开盖后可在2~8℃下保存16个小时。

运输过程中，本试剂盒在装有冰袋的泡沫箱中可保存6天。

本试剂盒在运输过程和使用过程中可耐受5次冻融。

生产日期及有效期至详见标签。

【适用仪器】

Agilent Stratagene Mx3000P荧光PCR仪、ABI Prism 7500荧光PCR仪、HHT GA2100基因检测仪。

【样本要求】

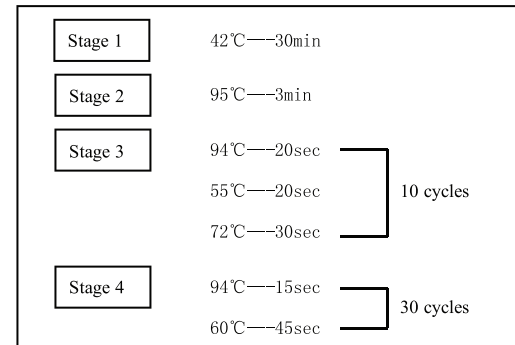
本试剂盒样本来源为已提取纯化的HCV RNA，HCV RNA采用已上市的核酸（RNA）提取试剂盒（QIAamp Viral RNA Mini Kit，德国Qiagen公司，货号：52904）制备，本试剂盒的HCV分型阳性质控品和HCV分型阴性质控品需采用相同的核酸（RNA）提取试剂盒进行核酸提取纯化。

制备好的HCV RNA置于2~8℃保存不超过3小时，-20±5℃保存不超过3天。

【检验方法】

1. 分别取各亚型HCV RT-PCR反应液38×(n+2)μL和酶系2×(n+2)μL，(n=受检样本数)，混匀，各管分别按40μL/管分装到PCR反应管中。再往各亚型HCV RT-PCR反应液中分别加入25μL矿物油，HCV RNA或质控品的提取产物各10μL。

2. 混匀，放入荧光PCR仪，按下列程序条件扩增：



荧光素设置：所有检测孔均设置为FAM和HEX（无HEX可设置为JOE）；

荧光信号收集：Stage4: 60℃---45sec；

反应体积：50μL。

3. 结果分析：反应结束后，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3~6，End值可设在10~20，调整阴性对照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。

4. 质量控制

（1）阴性质控品：各反应管均无典型S型扩增曲线或Ct值>26.5；

（2）阳性质控品：HCV 1b RT-PCR反应管中FAM标记曲线呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1；其余反应管中均无典型S型扩增曲线或Ct值>26.5

（3）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。

5.试验结果的判定

- (1) 如果检测样本无典型S型扩增曲线或Ct值>26.5，则判样本为HCV 1b、2a、3a、3b和6a阴性。
- (2) 如果检测样本呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1，则根据下表判断样本的亚型。

S 型扩增曲线所在的反应管	S 型扩增曲线所标记的荧光素	试验结果
HCV 1b RT-PCR 反应管	FAM	HCV 1b RNA 阳性
HCV 2a/6a RT-PCR 反应管	FAM	HCV 2a RNA 阳性
	HEX	HCV 6a RNA 阳性
HCV 3a/3b RT-PCR 反应管	FAM	HCV 3a RNA 阳性
	HEX	HCV 3b RNA 阳性

- (3) 上述扩增曲线有两个或以上呈典型S型扩增曲线且相应Ct值≤25.1，表明对应的HCV混合亚型阳性
- (4) 25.1<Ct≤26.5为检测灰区，建议复检，如复检结果仍为25.1<Ct≤26.5，则参照Ct值≤25.1进行判定。

【阳性判断值】

根据临床样本的试验结果，经统计学分析后，确定本试剂盒的Cut off值为25.1。

【检验结果的解释】

检测样本时，若HCV 1b RT-PCR反应管中FAM荧光素呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1，可能的情况是HCV 1b亚型感染或复合感染；若HCV 2a/6a RT-PCR反应管中FAM荧光素呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1，可能的情况是HCV 2a亚型感染或复合感染；若HCV 2a/6a RT-PCR反应管中HEX荧光素呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1，可能的情况是HCV 6a亚型感染或复合感染；若HCV 3a/3b RT-PCR反应管中FAM荧光素呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1，可能的情况是HCV 3a亚型感染或复合感染；若HCV 3a/3b RT-PCR反应管中HEX荧光素呈典型S型扩增曲线且Ct值≤25.1，可能的情况是HCV 3b亚型感染或复合感染。

【检验方法的局限性】

- 1. 样本中HCV 1b、2a、3a、3b、6a 各个单亚型RNA低于本试剂盒最小检出量无法检出。
- 2. 非1b、2a、3a、3b和6a单亚型或混合亚型的HCV样本无法检出。
- 3. 未在本试剂盒设计范围内的某些型别的突变和重组无法检测。
- 4. 由于国内以HCV 1b为主要亚型，其他亚型的样本难于收集，所以本试剂盒的阳性质控品仅为HCV 1b亚型阳性样本。

【产品性能指标】

- 1. 最低检出量：对样本中HCV 1b、2a、3a、3b、6a各个单亚型RNA的最低检出量均为1.0×10³ IU/mL。
- 2. 精密度：对HCV 1b、2a、3a、3b、6a各个单亚型样本的检测精密度（CV）均小于5%。
- 3. 特异性：本试剂盒与HBV、HEV、HIV、CMV以及部分其他亚型的HCV均无交叉反应。

【注意事项】

- 1. 本品仅用于体外诊断。
- 2. 实验前请仔细阅读本说明书。
- 3. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样品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，操作中使用的试管、吸头丢弃前需经灭菌处

理。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》。

- 4. 试剂盒阴性质控品和阳性质控品虽经验证病毒已灭活，但没有任何一种已知的测试方法可以完全确保人源性物质不含有传染性物质。所有人源性物质都可能具有潜在的传染性，操作时应视为传染性物质进行处理。
- 5. 实验人员必须进行专业培训。PCR实验应分别在体系配制室、样品处理室，PCR加样室，和PCR扩增室分别进行，各室应相对分隔。人和实验用物品应从样品处理室 → PCR加样室 → PCR扩增室单向流动，PCR试剂盒不可存放于扩增区。
- 6. 为样品处理室和PCR加样室提供负压超净工作台，样品处理和PCR加样应在负压超净工作台中进行。实验过程中请穿工作服，带一次性手套，使用自卸管移液器。
- 7. 对每次实验进行质量控制。
- 8. PCR反应使用的PCR反应管、离心管、吸头等应高压灭菌并一次性使用。
- 9. 标本制备区所用过的吸头请打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。
- 10. 实验完毕用10%次氯酸或70%酒精或紫外线灯处理工作台和移液器。

【参考文献】

- 【1】 Bullock GC, Bruns DE, Haverstick DM. Hepatitis C genotype determination by melting curve analysis with a single set of fluorescence resonance energy transfer probes. Clin Chem 2002;48(12):2147–54.
- 【2】 Chan SW, McOmish F, Homes EC, et al. Analysis of a new hepatitis C virus genotype and its phylogenetic relationship to exiting variants. J Gen Virol 1992;73:1131–41.
- 【3】 Choo Q-L, Richman KH, Han JH, Berger K, et al. Genetic organisation and diversity of hepatitis C virus. Proc Natl Acad Sci USA 1991;88:2451–5.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：泰普生物科学（中国）有限公司
住所：厦门市思明区前埔工业园55号409单元
联系方式：0592-3737666 咨询热线：400-7032032 网址：www.tibchina.com
售后服务单位：泰普生物科学（中国）有限公司
联系方式：0592-3737666 咨询热线：400-7032032 网址：www.tibchina.com
生产地址：厦门市同安区西洲路2041号101、201、301单元；2045号101、201、501单元
生产许可证编号：闽药监械生产许20110184号
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20143401926
【说明书批准日期及修改】2014年10月29日批准；2014年12月30日修改；2017年10月27日修改；2018年03月15日修改；2019年05月20日修改；2020年03月18日修改。