

丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

说明书

【产品名称】

丙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】 24 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测人血清或血浆样本中的丙型肝炎病毒（HCV）RNA。

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 技术，适用于疑似感染者辅助诊断和接受抗病毒治疗的丙型肝炎患者，可通过对血液样本中 HCV RNA 基线水平和变化情况进行监测，检测结果可用于丙型肝炎的辅助诊断和抗病毒药物的疗效观察。检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标，必须结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。本试剂不用于血源筛查。

【检验原理】

本试剂盒采用磁珠法提取血清或血浆样品中的 HCV-RNA，利用针对 HCV 核酸保守区设计的一对特异性引物，一条特异荧光探针（TaqMan 探针 5’末端标记 FAM 荧光素），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 HCV-RNA 的定量检测。

本试剂盒设置了阳性内对照（HCV 内标），HCV 内标 TaqMan 探针 5’末端标记 HEX 荧光素，通过检测内标是否正常来检测待检测样本中是否具有 PCR 抑制物，避免 PCR 假阴性。

【主要组成成分】

	序号	组分	主要成分
磁珠法核酸 提取试剂	1	RNA 提取液 1	异硫氰酸胍、十二烷基硫酸钠、三（羟甲基）氨基甲烷-盐酸缓冲液、聚乙二醇辛基苯基醚
	2	RNA 提取液 2	4-羟乙基哌嗪乙磺酸、氯化钠、七水合磷酸氢二钠
	3	RNA 提取液 3	氯化钠、三（羟甲基）氨基甲烷-盐酸缓冲液、聚乙二醇辛基苯基醚、乙醇
	4	RNA 提取液 4	三（羟甲基）氨基甲烷-盐酸缓冲液
	5	RNA 提取液 5	TE 缓冲液
	6	磁珠悬浮液	硅基磁珠
	7	蛋白酶 K	蛋白酶 K 溶液
	8	核酸助沉剂	Acryl Carrier 溶液

扩增反应试剂	1	HCV 内标	质粒
	2	HCV PCR 反应液	Taq 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、氯化镁、引物、探针、反转录酶、Taq DNA 聚合酶
	3	HCV 定量参考品 A	血清
	4	HCV 定量参考品 B	血清
	5	HCV 定量参考品 C	血清
	6	HCV 定量参考品 D	血清
	7	HCV 阴性对照	血清
	8	HCV 阳性对照	血清

备注：

- 1) HCV 定量参考品 A~D 的具体浓度请参照试剂盒内给定值。
- 2) 自备试验器材：经高压灭菌（121℃，30 分钟）处理的 1.5ml 离心管、0.2ml PCR 反应管；离心机；震荡混合器；（磁珠）分离器；各种规格的加样枪及相应的 Tip 头（建议使用带滤芯的，规格 10μl、200μl、1000μl）。

【储存条件及有效期】

试剂应避免光密闭保存，其中磁珠法核酸提取试剂置于 2～8℃下保存（蛋白酶 K 组分需要放置-20±5℃保存），扩增反应试剂置于-20±5℃保存。试剂盒有效期为 12 个月，避免反复冻融。

试剂盒在规范操作开瓶后再次使用时在有效期内可保持有效性，不影响正常使用；为了避免多次取用过程中的错误操作造成试剂损坏，请避免反复冻融；试剂盒的不同组分保持在规定温度下正常运输不会造成试剂失效。

生产日期、有效期至详见外包装。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、Stratagene Mx3000P 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

- 1.适用样本类型：血清或血浆。
- 2.采集：
- 2.1 血清样本采集：使用无菌注射器抽取 2ml 受检者静脉血注入无菌收集管中，室温放置不要超过 4 小时，待样本析出血清或 1600rpm 离心 5~20 分钟分离出血清，抽取血清注入另一无菌离心管中备用。
- 2.2 血浆样本采集：使用无菌注射器抽取 2ml 受检者静脉血注入含有 EDTA 或枸橼酸钠抗凝剂的无菌收集管中，1600rpm 离心 5-20 分钟，吸取血浆于另一无菌离心管中备用。
- 3.保存和运输：上述样本可立即用于检测，2~8℃可保存 72 小时，-20±5℃可保存三个月，-70℃以下可长期保存，为了避免多次取用过程中的错误操作造成样本损坏，避免反复冻融；样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行

运输。

【检验方法】

1.试剂配制（操作区域：试剂准备区）

1.1 取出各组分试剂，室温放置，提取液如出现沉淀，可放置 37℃水浴溶解后混匀备用。

1.2 提取液 2-mix 配制比例：RNA 提取液 2 为 100μl/人份，HCV 内标 1μl/人份。以上比例为配制 1 人份提取液 2-mix 试剂比例，进行一次检测至少配制人份量为：待测样本量+阴性对照（1 份）+阳性对照（1 份）+HCV 定量参考品 A~D（4 份）。 提取液 2-mix 瞬时离心 5 秒后备用。

1.3 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 。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：待测样本量+阴性对照（1 份）+阳性对照（1 份）+HCV 定量参考品 A~D（4 份）。

1.4 PCR 反应液分装：将反应体系按 30μl/管分装至 PCR 反应管或者反应板中。

2.样本处理（操作区域：样本处理区）

2.1 阴性对照、阳性对照与定量标准品需与待测样本同步处理。

2.2 取足量 1.5ml 灭菌离心管，标记好待测样本号、阴性对照、阳性对照及定量标准品 1~4，每管加入 300μl 提取液 1、64μl 蛋白酶 K-mix 、20μl 磁珠、100μl RNA 提取液 2、200μl 待测样本或阴性对照、阳性对照、定量参考品 A~D；盖紧管盖，震荡混匀 10 秒，室温颠倒混匀 15 分钟。

2.3 瞬时离心后将离心管置于磁力架上，2 分钟后吸出溶液丢弃。

2.4 每管加入 550μl RNA 提取液 3，震荡混匀 5 秒，瞬时离心 5 秒后将离心管再次置于磁力架上，2 分钟后吸出溶液丢弃。

2.5 每管加入 600μl RNA 提取液 4，震荡混匀 5 秒，瞬时离心 5 秒后将离心管快速置于磁力架上，2 分钟后吸出溶液丢弃；室温开盖放置 3 分钟吸走管内残液。

2.6 每管加入 50μl 提取液 5，反复吹打液体，55℃温浴 10 分钟，期间轻轻晃动溶液两次，置于磁力架吸附 2 分钟，将液体转移到新的离心管中备用。

3.加样（操作区域：样本处理区）

分别取已处理好的样本、阴性对照、阳性对照、定量参考品 A-D 各 20ul 分别加到装有反应体系的 PCR 管或者 PCR 反应板中。盖上管盖离心数秒转至扩增检测区。

4.PCR 扩增（操作区域：PCR 扩增与分析区）

4.1 PCR 扩增前，请参照 PCR 仪说明书进行设置，保证扩增过程操作正确。

4.2 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 及待测样本，并设置样本名称及定量参考品浓度。

4.3 荧光检测通道选择：

ABI、Stratagene 系列仪器设置如下：

HCV-RNA 检测：FAM 通道（Reporter：FAM,Quencher：none）

HCV-内标：HEX/VIC 通道（Reporter：HEX/VIC,Quencher：none）

设置 Reaction Volume 为 50

4.4 样本的设定：

在扩增开始前条件设定时，HCV 定量参考品设为“Standard”并输入试剂盒内给定浓度值；带检样本和对照品设定为“Unknown”或“Sample”。

4.5 循环参数设定

表 1 ABI、Stratagene 系列仪器参数设置

步骤		温度	时间（分：min，秒：s）	循环数
1	逆转录	50℃	30min	1
2	cDNA 预变性	95℃	3min	1
3	变性	95℃	15s	45
	退火，延伸，荧光收集	60℃	45s	
4	仪器冷却	25℃	10s	1

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

5.结果分析条件设定

反应结束后自动保存结果，对 HCV 的曲线和相应 HCV 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平直或低于阈值线），点击 Analyze 进行分析，使各项参数符合下述“6.质量控制”的要求，然后到 Plate 窗口下记录定量结果。

注：具体设置方法请参照各仪器使用说明书。

6.质量控制：

6.1 四个 HCV 定量参考品：均检测为阳性，且标准曲线相关系数 $|r| \geq 0.980$ ，HCV-内标检测为阳性（ $16 < Ct < 40$ ）。

6.2 HCV 阴性对照：无 Ct 值显示，但 HCV 内标检测为阳性（ $16 < Ct < 40$ ）。

6.3 HCV 阳性对照：检测浓度值约为 10^4 IU/ml，HCV-内标检测为阳性（ $16 < Ct < 40$ ）。

6.4 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。

【参考区间】

通过参考值的研究实验确定本试剂盒的定量上限为 1×10^8 IU/ml，定量下限为 100IU/ml,检测限为 50IU/ml；内标 Ct 参考值（ $16 < Ct < 40$ ）。

【检验结果的解释】

- 1.检测值在定量线性范围 100IU/ml-1×10⁸IU/ml 内的样本，且扩增曲线呈明显 S 型，直接报告相应测定结果。
- 2.检测值＞1×10⁸IU/ml 的样本，且扩增曲线呈明显 S 型，可直接报告结果为＞1×10⁸IU/ml；若需要确定精确结果，可将血清或血浆样本 1000 倍稀释，使其拷贝数落在 100IU/ml-1×10⁸IU/ml 范围内，再重新进行检测，结果以稀释倍数进行校准。
- 3.对于 50IU/ml≤测定值<100IU/ml 的样本，且扩增曲线呈明显 S 型，同时，内标检测为阳性且 Ct<40，表明病毒载量低，可直接报告测定值，但注明：所测定量结果仅供参考。
- 4.检测值<50IU/ml 的样本，且内标检测为阳性（Ct<40），则报告 HCV-RNA 含量低于试剂盒检测下限；若内标 Ct>40 或无显示，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.样本检测结果与样本的收集、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。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。
- 2.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/特征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
- 3.本试剂盒仅用于血清或血浆样本检测。

【产品性能指标】

- 1.本试剂盒检测 HCV RNA 国家参考品(或经国家参考品标化的企业参考品)，9 份阳性质控品 P1-P9，8 份阴性质控品 N1-N8，精密度质控品 E1-E2，检测符合率为 100%，灵敏度参考品 L1-L9 阳性结果符合质量标准，定量范围符合质量标准。
- 2.精密度试验表明：批内和批间重复性好，测量高浓度（4×10⁵IU/ml）和低浓度（4×10²IU/ml）样本的检测结果 Ct 值的变异系数≤5%。
- 3.本试剂盒可检测 HCV 1b、2a、3b、6a 各基因型，最低检出量为 50IU/ml，定量线性范围 100IU/ml-1×10⁸IU/ml。
- 4.特异性

临床特异性：通过三家医院在临床使用中对研制的产品的主要性能指标与同类已上市产品罗氏分子诊断公司生产“丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光法)”进行对比试验。宝瑞源生物技术（北京）有限公司生产的丙型肝炎病毒核酸（RNA）检测试剂盒(荧光 PCR 法)中的 HCV RNA 检测的临床阳性符合率为 100%，阴性符合率为 95.96%，总符合率为 99.2%。

交叉反应：本试剂盒与甲型肝炎病毒（HAV）、乙型肝炎病毒（HBV）、人类免疫缺陷病毒（HIV）、梅毒螺旋体（TP）、巨细胞病毒（CMV）、EB 病毒（EBV）和单纯疱疹病毒（HSV）等无交叉反应。

干扰物质：样本中胆红素为 50μmol/L、血红蛋白为 200g/L、甘油三酯为 1.7mmol/L、总 IgG 为 16g/L、EDTA 为 2.5mg/mL，对试剂盒的检测结果没有影响。

【注意事项】

- 1.本试剂盒仅用于体外诊断，开始检测前请仔细阅读本说明书全文。
- 2.本试剂盒不适用于肝素作抗凝剂收集的人血清或血浆，因肝素对 PCR 反应有抑制作用。
- 3.所有试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。提取样本核酸前，请确保提取液 1~5 的温度平衡至室温或以上，建议室温放置 1 小时以上或置于 37℃水浴 30 分钟以上。
- 4.对于检测为阴性的样本，应确定 HCV 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，HCV 内标的扩增信号也应考虑。
- 5.由于 HCV 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、枪头一次性耗材等在实验前应全部高压灭菌，确保无 RNA 酶污染。
- 6.若荧光 PCR 仪无 HEX 和 VIC 检测通道，可忽略内标监测，“1.2”步骤中请不要加内标，以免引起多色荧光干扰。如另有疑问，可咨询公司技术人员。
- 7.为避免在移液过程中污染反应体系，建议使用一次性的枪头；样本处理阶段应每吸取一次液体换一个枪头，以防止样本间的潜在交叉污染。
- 8.不要将贴有不同标签的试剂混合使用，也不要将不同批号的试剂混合使用。
- 9.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，试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。
- 10.所有检测样本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；样本操作、废弃物处理均需符合相关法律法规要求：卫生部《微生物生物学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【标识的解释】

标识	说明
	查阅使用说明
	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- 1.《医疗器械说明书、标签和包装标识管理规定》
- 2.《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》
- 3.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》，国食药监械[2007]240 号
- 4.丙型肝炎防治指南。中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会联合制订。

【生产企业】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

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：010-69390066 010-69390623

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：010-69390066 010-69390623

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

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】国械注准 20153400528

【说明书批准及修改日期】

第 1 次核准及修改日期：2015 年 04 月 03 日

第 2 次核准及修改日期：2020 年 05 月 11 日