

乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒 (1+2 型) 核酸检测试剂盒 (PCR- 荧光法) 说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒 (1+2 型) 核酸检测试剂盒
(PCR- 荧光法)

商品名称：无

英文名称：Nucleic Acid Testing Kit for HBV DNA, HCV RNA and HIV RNA (Type 1+2) (Real-time PCR)

汉语拼音：YixingGanyan Bingdu, BingxingGanyan Bingdu, RenleiMianyiQuexian Bingdu(1+2 Xing) Hesuan Jiancexi Shijihe (PCR-Yingguangfa)

【包装规格】

96 测试 / 盒、48 测试 / 盒。

【预期用途】

本产品用于定性检测血浆 / 血清样本中乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV) 及人类免疫缺陷病毒 1+2 型 (HIV-1、HIV-2) 的核酸。

检测方式可分为单人份样本检测，不大于 6 份样本混合检测或不大于 48 份样本混合检测，对于混合阳性样本须进行单人份拆分检测。

【检验原理】

病毒核酸提取采用磁珠分离纯化技术。扩增检测采用荧光 TaqMan PCR 技术。该方法包括三个主要步骤：

- (1) 样本制备以及磁分离纯化 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA、HIV-2 RNA；
- (2) 制备 TaqMan PCR 反应体系；
- (3) UNG 酶除污染及 RNA 逆转录成 cDNA；
- (4) PCR 扩增及特异性荧光检测。并有相应的非竞争性内参即内标参与上述三个步骤。

样本制备采用磁珠捕获技术，待测样本在含胍盐的裂解液强力变性下，病毒颗粒裂解，释放出核酸，并保护 DNA、RNA 免受样本中 DNA 酶、RNA 酶的破坏。混合物经孵育后，核酸特异性结合于磁珠表面，非特异性结合的一些物质如盐、蛋白质及其他的细胞杂质经洗涤液洗涤磁珠后除去。经磁分离和后续的洗脱步骤，吸附于磁珠的核酸被洗脱到洗脱液中作为 PCR 反应的模板。模板加入 PCR 反应液中，转移至荧光 PCR 仪中进行 RT-PCR 或 PCR 扩增，并经水解探针完成实时荧光检测。逆转录采用适宜的缓冲液、优化的逆转录酶耐热 DNA 聚合酶组合及合适

的温度，使逆转录和 PCR 扩增在同一管中高效进行，为一步法 RT-PCR 体系。

采用的荧光 TaqMan PCR 技术为：使用荧光标记的探针，通过采集检测扩增过程中荧光报告基团发出的荧光强度，实时监控 PCR 产物的数量。靶基因探针与内标探针均带有荧光报告基团和淬灭基团，通过标记不同激发光的荧光基团来区分，在不同的波长区独立检测。当探针为完整时，荧光报告基团接近淬灭基团，由于 Förster 能量转移效应，荧光被抑制。PCR 扩增过程中，探针与靶序列杂交，并为 Taq DNA 聚合酶的 5' → 3' 核酸酶活性所切割。一旦荧光报告基团和淬灭基团分离，淬灭作用被解除，荧光报告基团释放。该过程通过预设循环数的重复进行，每次有效循环均会导致报告基团的荧光强度的增加，仪器于不同波长区独立检测靶基因和内标基因^[3,11]，扩增曲线开始指数生长时的 PCR 循环数与起始样本的模板数呈 2 的指数倍增加。内标的全程使用可以监测提取及扩增是否正常进行，避免发生检测假阴性。

检测过程可分成如下三部分：

- A、使用全自动或半自动样本处理系统对样本进行吸样、混样、核酸提取、PCR 体系建立；
- B、使用 4 通道及以上荧光定量 PCR 仪器进行核酸扩增和检测；
- C、使用特定软件进行结果分析和报告。

【主要组成成分】

类别	试剂名称	产品规格	
		96 测试 / 盒	48 测试 / 盒
核酸提取试剂	裂解液	111mL × 2	111mL × 1
	去抑制剂	8mL × 2	8mL × 1
	去垢剂	1.55mL × 2	1.55mL × 1
	磁珠悬液	7.75mL × 4	7.75mL × 2
	洗涤液 A	44mL × 2	44mL × 1
	洗涤液 B	49mL × 2	49mL × 1
扩增检测试剂	洗脱液	6.5mL × 2	6.5mL × 1
	PCR 反应液 A	605μL × 2	605μL × 1
	PCR 反应液 B	775μL × 2	775μL × 1
	PCR 反应液 C	605μL × 2	605μL × 1
	内标	1000μL × 2	1000μL × 1
	阴性对照	2mL × 2	2mL × 1
	阳性对照	2mL × 2	2mL × 1

注：不同批次组分不得混用。

【储存条件及有效期】

核酸提取试剂储存于 2 ~ 8℃；
扩增检测试剂储存于 -15℃ 以下（避光），反复冻融次数建议不超过 3 次；
本试剂盒有效期为 12 个月，要求在有效期内使用。

【适用仪器】

核酸提取仪：
全自动化核酸提取工作站 (Hamilton Microlab STAR IVD 等)。
荧光 PCR 仪器：
具备 4 色及以上检测通道功能的荧光 PCR 仪 (ABI7500、ABI QuantStudio™ 5、伯乐 CFX96、天隆 Gentier 96E 等)。

【样本要求】

注意：1、所有样本都要视为传染源来进行处理。
2、切勿冷冻全血。
3、样本的采集、保存、运输按国家卫生健康委员会相关文件要求进行。

适用样本类型为血清或血浆。样本采血管应使用无菌采血管。血浆采用 EDTA 盐、枸橼酸钠等抗凝剂抗凝，血浆样本需充分抗凝。血浆样本使用前应平衡到室温。

1) 样本保存稳定性：在室温条件 (15-30℃) 下可最多保存 48 小时，在 2-8℃ 下可最多保存 7 天，在 -15℃ 以下最多保存 6 个月；

2) 样本反复冻融稳定性：最多可冻融 5 次。
由于部分样本抗凝不充分和/或含有丰富的纤维蛋白、凝血因子等物质易形成所谓的“冷沉淀”，建议将所有平衡到室温的血浆样本 1000 ~ 3000g 离心 10 分钟，使大多数“冷沉淀”位于管底，避免样本混样时吸头频频发生堵塞的现象。

对于检测有反应性的样本，按国家卫生健康委员会相关文件要求处理。

【检验方法】

使用本产品可对血清/血浆样本进行混合样本检测或单人份样本检测。混合样本检测是先将样本按混合系数按照等体积混合，然后进行核酸提取和扩增检测。如果混合样本检测结果为反应性，需进行单人份拆分检测。单人份样本检测是对单个样本进行检测。检测结果根据本说明书的结果分析直接作为最终判定结果。样本检测可以先完成乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒免疫学标志物的检测。剔除免疫学标志物检测阳性的样本，将免疫学标志物检测阴性的样本进行核酸标志物检测。检测过程包括核酸提取、扩增检测、结果判读。

1. 样本分装与混样：

1.1 混合样本检测

使用自动化仪器或手工将样本按照混样系数进行等体积混合至 960μl 到汇集管内。对于全血和血液成分的捐献者不大于 6 份样本的混合检测可使用 Hamilton Microlab STAR IVD 全自动核酸提取工作站进行混样和混样后核酸提取。

对于原料浆供体，血浆样本可进行不大于 48 份样本混合检测可使用 Hamilton Microlab STAR IVD 全自动核酸提取工作站进行混样和混样后核酸提取。

1.2 单人份拆分检测

如混合样本检测为反应性，需对该汇集池内所有样本进行单人份拆分检测。单人份检测直接取 960μl 样本到汇集管，使用全自动核酸提取工作站对样本进行核酸提取。

2. 样本处理

2.1 核酸提取

核酸提取时，需根据提取样本数量计算试剂使用量，将计算好的各组分试剂量倒入相应试剂槽，运行核酸提取程序。

表 1：提取试剂各组分量表

组分	用量
磁珠悬液	240μl/测试
去抑制剂	110μl/测试
去垢剂	25μl/测试
内标	15μl/测试
裂解液	1.68ml/测试
洗涤液 A	850μl/测试
洗涤液 B	950μl/测试
洗脱液	70μl/测试

3. 核酸扩增

3.1 PCR 试剂准备及加样（在样本处理区进行）

3.1.1 取试剂盒中 [PCR 反应液 A]、[PCR 反应液 B]、[PCR 反应液 C] 室温融化混匀后，低速 (2000rpm) 离心数秒。

3.1.2 自动化移液平台完成 PCR 反应液的配制、分装、核酸提取产物加样。

PCR 反应液配制比例：[PCR 反应液 A]：[PCR 反应液 B]：[PCR 反应液 C] = 9μl：12μl：9μl，总体积为 30μl/反应。

核酸提取产物：30μl/反应

3.1.3 取出 PCR 板贴膜后转移至扩增检测区。

3.2 PCR 扩增检测（在扩增检测区进行）

3.2.1 将反应板放入荧光 PCR 扩增仪进行扩增检测。

3.2.2 采集信号通道选择：HBV DNA 选择“CY5”，HCV RNA 选择“FAM”，HIV RNA 选择“ROX”，内标选择“VIC/HEX”

3.2.3 循环参数设定：（请参照各类仪器的操作软件进行设置）

	步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶作用	25℃	5 分钟	1
2	逆转录反应	50℃	25 分钟	1
3	预变性	95℃	10 分钟	1
4	变性	95℃	10 秒	5
	退火	55℃	20 秒	
	延伸	72℃	20 秒	
5	变性	95℃	10 秒	40
	退火、延伸及检测荧光	60℃	45 秒	
步骤 5 中 60℃时采集荧光				

3.2.4 样本设置

在仪器软件的相应样本设置窗口内填写各样本的名称、类型。

4. 结果分析

根据各类荧光 PCR 仪器的软件进行分析，得到各样本的 HBV DNA、HCV RNA 和 HIV RNA 检测结果。[根据不同仪器、样本检测的具体情况设置基线、阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方]

【质量控制】

1. 阴性对照的 HBV、HCV、HIV 测定结果为非反应性，并且内标 CT 值 < 40。

2. 阳性对照的 HBV、HCV、HIV 测定结果为反应性。

【结果判定】

1. 测定 CT 值无数值，并且内标 CT < 40 的样本为非反应性。

2. 测定 CT 值无数值，并且内标 CT 值无数值的样本检测无效（简称 NTS）。

3. 测定 CT 值 < 40 的样本为反应性。

HBV 测定 CT 值 < 40 的样本为 HBV DNA 反应性样本；

HCV 测定 CT 值 < 40 的样本为 HCV RNA 反应性样本；

HIV 测定 CT 值 < 40 的样本为 HIV RNA 反应性样本。

4. 混合样本检测结果解释：

(a) 当混合样本检测结果为非反应性时，则将实际参与混样的各单个样本最终判为非反应性；

(b) 当混合样本检测出现反应性时，需采用拆分模式进行单份样本检测。

(b1) 当拆分模式单份样本检测结果为反应性时，则

最终该单份样本判为反应性；

(b2) 当拆分模式单份样本检测结果为非反应性时，则

最终该单份样本判为非反应性；

【检验方法的局限性】

1. 试剂盒主要针对血清/血浆样本中 HBV DNA、HCV RNA、HIV-1 RNA、HIV-2 RNA 核酸的定性检测，结果不能反应原始样本中病毒核酸含量。

2. 低于检测下限的样本不一定能检出。

3. 测定的可靠性还取决于样本的采集、运输、保存和前期处理等因素。

4. 核酸检测从理论上并不能完全检测出“窗口期”感染。

【产品性能指标】

检测项目		96 测试 / 盒、 48 测试 / 盒
最低检出量	HBV DNA	2.5 IU/ml
	HCV RNA	9 IU/ml
	HIV-1 RNA	20 IU/ml
	HIV-2 RNA	40 IU/ml

备注：1. 应用混样检测程序，最低检出量应不高于上表中各检测项目的最低检出量 × n IU/mL（其中 n=混样系数）

2. 经 PROBIT 分析，HBV DNA 平均 95% 最低检出量为 1.087 IU/ml（95% 置信区间上下限分别为：0.904 IU/ml、1.700 IU/ml），HCV RNA 平均 95% 最低检出量为 3.385 IU/ml（95% 置信区间上下限分别为：3.147 IU/ml、5.220 IU/ml）；HIV-1 RNA 平均 95% 最低检出量为 12.957 IU/ml（95% 置信区间上下限分别为：10.026 IU/ml、22.156 IU/ml）；HIV-2 RNA 平均 95% 最低检出量为 22.592 IU/ml（95% 置信区间上下限分别为：21.123 IU/ml、40.808 IU/ml）。

3. 基因型

本试剂盒能有效覆盖 HBV DNA—A、B、C、D、E、F、G、H 各亚型的检测。

本试剂盒能有效覆盖 HCV RNA—1、2、3、4、5、6 各亚型的检测。

本试剂盒能有效覆盖 HIV-1 RNA—M 组基因型、O 组基因型、N 组基因型各亚型的检测 HIV-2 RNA 基因型的检测。

【注意事项】

1. 核酸样本的采集管推荐使用含有分离胶的无菌采血管，无 RNA 酶污染。

2. 试剂盒各组分使用前请平衡至室温，充分融化后摇匀，离心管内的试剂需离心数秒后使用。

3. 应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性用品，建议使用带滤芯吸嘴。
4. PCR 操作人员应具有经验和受过培训。
5. 操作过程中用到的仪器设备应经常用 70%-80% 乙醇及紫外灯照射处理。
6. 实验中产生的废弃物应统一消毒处理，防止污染。
7. 阴性对照、阳性对照和待检样本平行进行操作。
8. 使用本试剂盒检测，请按传染病实验室检查规程操作^[3]。

【参考文献】

1. Schreiber, G.B., Busch, M.P., Kleinman, S.H. & Korelitz, J.J. The Risk of Transfusion-Transmitted Viral Infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *The New England Journal of Medicine*, 1996, 334, 1685-1690.
2. Barrera, J.M., Francis, B., Ercilla, G., Nelles, M., Achord, D., Damer, J. & Lee, S.R. Improved detection of anti-HCV in post-transfusion hepatitis by a third-generation ELISA. *VoxSanguinis*, 1995, 68, 15-18.
3. Busch, MP., Kleinman, SH., Jackson B, et al. Nucleic acid amplification testing of blood donors for transfusion-transmitted infectious diseases. Report of the Interorganizational Task Force on Nucleic Acid Amplification Testing of Blood Donors. *Transfusion*, 2000, 40: 143
4. Wiedmann M et al. HIV-1, HCV and HBV seronegative window reduction by the new Roche cobas® TaqScreen MPX test in seroconverting donors. *J Clin Virol*. 2007 Aug;39(4):282-7
5. Margaritis AR et al. Comparison of two automated nucleic acid testing systems for simultaneous detection of human immunodeficiency virus and hepatitis C virus RNA and hepatitis B virus DNA. *Transfusion*, 2007 Oct;47(10):1783-93
6. Linouts S et al. PRISM hepatitis B surface antigen detection of hepatitis B virus minipool nucleic acid testing yield samples. *Transfusion*, 2008 Jul;48(7):1376-82
7. Li L et al. A pilot study for screening blood donors in Taiwan by nucleic acid amplification

technology: detecting occult hepatitis B virus infections and closing the serologic window period for hepatitis C virus. *Transfusion*, 2008 Jun;48(6):1198-206

8. Lisa Jarvis et al. Evaluation of the Roche cobas s201 system and cobas TaqScreen multiplex test for blood screening: a European multicenter study. *Transfusion*, 2008;48(9):1853-1861
9. Yoshikawa A et al. Lengths of hepatitis B viremia and antigenemia in blood donors: preliminary evidence of occult (hepatitis B surface antigen-negative) infection in the acute stage. *Transfusion*, 2007;47:1162-71
10. Chudy M et al. Hepatitis B virus genotype G monoinfection and its transmission by blood components. *Hepatology*, 2006;44:99-107
11. 吴剑媚、张庆武. 核酸检测技术在血液病毒筛查中的应用及风险评估. 临床输血与检验, 2008 年 Vol.10 No.1
12. 任芙蓉. 核酸检测技术在国内外血液筛查中的应用. 北京医学, 2008 年 Vol.30 No.8
13. 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 血站技术操作规程 (2019 版) 国卫医函〔2019〕98 号

【生产企业】

上市许可持有人 / 生产企业名称: 上海科华生物工程股份有限公司

上市许可持有人地址: 上海市徐汇区钦州北路 1189 号

生产地址: 上海市徐汇区桂平路 701 号

邮政编码: 200233

电话: 021-64850088

服务热线: 8008203370 4009201238

网址: <http://www.skhb.com>

【药品生产许可证号】

沪 20160164

【药品批准文号】

国药准字 S20220004

【执行标准】

YBS00372023

【说明书核准日期及修改日期】

核准日期: 2022 年 01 月 25 日

修改日期: 2023 年 06 月 07 日

版号: 568-V2.0-XX

SHANGHAI KEHUA BIO-ENGINEERING CO.,LTD.



2023.6.27