

丙型肝炎病毒核酸定量和基因分型检测试剂盒
(荧光 PCR 法) 使用说明书

【产品名称】

丙型肝炎病毒核酸定量和基因分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测人血清样本中的丙型肝炎病毒（hepatitis C virus, HCV）RNA，并同时检测 1 型和 2/3 型 HCV 进行基因分型检测（本品不区分 2 型和 3 型 HCV）。本品有助于 HCV 感染的辅助诊断和药物治疗效果的监测评价。

丙型肝炎呈全球性流行，是欧美及日本等国家终末期肝病的最主要原因。据世界卫生组织统计，全球 HCV 的感染率约为 3%，估计约 1.7 亿人感染 HCV，每年新发丙型肝炎病例约 3.5 万例。HCV 1b 和 2 型基因型在我国较为常见，其中以 1b 型为主；某些地区有 1a、2b 和 3b 型报道；6 型主要见于香港和澳门地区，在南方边境省份也可见此基因型。

检测结果仅供临床参考，不能单独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。本试剂盒不得用于血源筛查。

【检验原理】

本试剂盒基于 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术。首先通过逆转录酶将 HCV RNA 反转录成 cDNA，而后，以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增；在 PCR 反应过程中，同时利用 Taq 酶的 5'→3' 聚合酶活性和核酸外切酶活性，使得 TaqMan 探针降解，荧光报告基团和淬灭基团分离使得荧光信号发射，FAM 通道定量检测 HCV RNA，VIC 通道定性检测 1 型 HCV，ROX 通道定性检测 2/3 型 HCV，CY5 通道检测内参。

本试剂盒使用外源性内参，可以监控和避免由于样本中的 PCR 抑制物或操作不当引起的“假阴性”结果；并使用 UNG 酶，可有效避免扩增产物的污染。

【主要组成成分】

组分名称	装量	每个反应中用量	组成成分
RT-PCR 缓冲液 A	480 μL	15 μL	三羟甲基氨基甲烷、盐酸、脱氧核糖核苷酸、镁离子
RT-PCR 混合酶 A	320 μL	10 μL	Taq 酶、逆转录酶、尿嘧啶-N-糖基化酶
HCV 引物探针	160 μL	5 μL	引物和探针
内参 A	160 μL	5 μL	慢病毒
HCV 定量校准品 S1	400 μL	—	慢病毒
HCV 定量校准品 S2	400 μL	—	慢病毒
HCV 定量校准品 S3	400 μL	—	慢病毒
HCV 定量校准品 S4	400 μL	—	慢病毒
HCV 定量校准品 S5	400 μL	—	慢病毒
HCV 强阳性对照	400 μL	—	慢病毒
HCV 临界阳性对照	400 μL	—	慢病毒
阴性对照	600 μL	—	阴性血浆

注：1. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换。慢病毒为人工构建，不具有丙肝病毒传染性。HCV 定量校准品、阳性对照品的定量值每批次不同，详见试剂盒中附页。2. 自备实验耗材：适用规格的离心管、微量移液器等。3. 本试剂盒推荐搭配本公司生产的核酸提取及纯化试剂（产品型号：体液 RNA）（沪宝械备 20140001 号）使用，配套仪器可使用基于磁珠法吸附原理的核酸提取仪。

【储存条件及有效期】

试剂盒应于 -15℃~ -25℃ 的条件下避光、密封保存。有效期 12 个月。

生产日期和失效日期见标签。试剂盒开封后一周内使用，且反复冻融次数不超过 3 次。

【适用仪器】

本品适用于实时荧光定量 PCR 仪，Life Technologies 7500。

【样本要求】

血清：用一次性的针筒或不含抗凝剂的真空采血管抽取病人静脉血 5 mL，置于灭菌的一次性试管中或真空采血管中室温放置，取分离后的血清送检。

血清样本于 2~8℃ 可放置 48 小时，分离后的血清样本 -20℃ 下可长期保存。样本应避免反复冻融。分离后的血清样本在运输过程中需用冰壶保存，以保证样本始终处于冷冻状态，使用前需平衡至室温。

一般在患者治疗开始后 1~3 个月检测 1 次，以后每 3~6 个月检测 1 次。

【检验方法】

1. 试剂配制

应在冰盒内进行试剂配制操作，按反应样本数（反应样本数 = 待检样本数 + HCV 对照品 3 个 + HCV 定量校准品 5 个 + 1）n 配制反应液：

向离心管内加入 RT-PCR 缓冲液 A n×15 μL、RT-PCR 混合酶 A n×10 μL、HCV 引物探针 n×5 μL，振荡混匀，低速离心数秒，按每管 30 μL 分装到反应管中，于 2~8℃ 放置，并在 4 小时内进行 RT-PCR 扩增。

2. 样本（含对照品、校准品）预处理

将待检样本、内参 A、HCV 对照品、HCV 定量校准品于室温下融解后，振荡混匀，8000 rpm 室温离心 1 分钟。

3. 核酸提取

请使用磁珠法提取试剂对样本（含对照品、校准品）进行核酸提取。推荐使用本公司生产的核酸提取及纯化试剂（产品型号：体液 RNA）。

核酸提取所需样本体积为 400 μL，并在每个待提取样本中加入 5 μL 内参 A；核酸提取完成后，应在 10 分钟之内将核酸提取液（RNA）加入反应管中，或将核酸提取液（RNA）转移到离心管中于 -20℃ 保存。

4. 加样

按照阴性对照、阳性对照、定量校准品和待检样本的顺序，分别取提取产物各 20 μL 加入反应管中，盖紧管盖，低速离心数秒后，置于实时荧光定量 PCR 仪中。

5. RT-PCR 扩增

步骤 1：50℃ 反应 25 分钟，循环 1 次；

步骤 2：95℃ 保温 5 分钟，循环 1 次；

步骤 3：95℃ 15 秒→60℃ 50 秒，循环 5 次；

步骤 4：95℃ 15 秒→60℃ 50 秒，循环 40 次，于 60℃ 采集 FAM、VIC、ROX 和 CY5 荧光通道的信号。

注：在荧光定量 PCR 仪软件操作界面，参比荧光（Passive Reference）下拉菜单中选择“none”。

6. 质量控制

每次检测均应设置阴性对照、强阳性对照、临界阳性对照和定量校准品。检测结果应达到下表的要求，否则该次检测无效，应检查仪器、试剂和扩增条件等方面的误差，重复实验。

当质控检测有效时，应检查每个样本内参 CY5 通道的 Ct 值，Ct 值的有效范围为 18~34，同时呈现明显的 S 型扩增曲线。

质控品	质控要求			
	FAM 通道	VIC 通道	ROX 通道	CY5 通道
HCV 定量校准品	定量标准曲线相关系数 $ r \geq 0.980$	UNDET	12≤Ct<30	18≤Ct<34
HCV 强阳性对照	18≤Ct<24，量值符合附页要求	UNDET	18≤Ct<24	18≤Ct<34
HCV 临界阳性对照	27≤Ct<36，量值符合附页要求	27≤Ct<36	27≤Ct<36	18≤Ct<34
阴性对照	UNDET	UNDET	UNDET	18≤Ct<34

- 注：1. 四个通道可自动设定基线：Auto Baseline，或根据曲线形状自行调节；
2. 除 CV5 通道外，其余三个通道的阈值设定（Threshold）均应高于试剂盒阴性对照；
3. “UNDET”表示“未检出”。

【阳性判断值】

FAM 通道阳性判断值设定 Ct 值为 38，且扩增曲线呈 S 型。

VIC 和 ROX 通道阳性判断值设定 Ct 值为 40，且扩增曲线呈 S 型。

【检验结果的解释】

仪器 PCR 程序运行完成后，按软件要求进行结果保存和数据分析。参考试剂盒中附页，在 FAM 通道内输入 HCV 定量校准品的量值，软件将自动给出标准曲线，计算各样本的 HCV RNA 含量 C（IU/mL）。

HCV RNA 含量（C）	解释
“UNDET”	报告结果为“未检测到 HCV RNA”。
$C < 15 \text{ IU/mL}$	计算所得的结果低于最低检测限。报告结果为“低于检测限”。
$15 \text{ IU/mL} \leq C \leq 1 \times 10^8 \text{ IU/mL}$	计算所得的结果在线性范围内。报告定量值。
$C > 1 \times 10^8 \text{ IU/mL}$	计算所得的结果高于线性范围上限。报告结果为“大于 $1 \times 10^8 \text{ IU/mL}$ HCV RNA”。如果希望得到准确的定量结果，原始样本应使用 HCV RNA 阴性血清稀释并再次检测，报告结果乘以稀释因子。

对 FAM 通道有扩增曲线的阳性样本，以 VIC 和 ROX 通道的 Ct 值判断 HCV 基因型。

VIC 通道	ROX 通道	解释
$Ct < 40$	UNDET	1 型
UNDET	$Ct < 40$	2/3 型
$Ct < 40$	$Ct < 40$	1 型混合 2/3 型
UNDET	UNDET	未检出 1/2/3 型

当定量检测结果为“未检测到 HCV RNA”，基因分型结果不作考虑。

实验室环境污染、试剂污染或者样本交叉污染会导致检测出现假阳性结果。试剂运输、保存不当或使用时操作不准确将引起试剂检测效果的下降、甚至出现假阴性结果。试验检测结果仅供临床参考，不能作为病毒感染确诊、治疗或者其他临床管理的唯一依据。

【检验方法的局限性】

1. 本试剂盒定量检测到阳性结果不能表明是否存在活病毒。建议同时采用其它方法进行确认。
2. 本试剂盒可对 1、2、3、4、5、6 型 HCV 进行定量检测，但不能区分 4、5、6 型具体基因型别。
3. 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/体征、病史、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
4. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
5. 试剂盒虽然设计时选择相对保守的片段进行扩增及检测，但在理论上仍无法完全避免对保守区可能存在罕见突变的 HCV 病毒的漏检。
6. HCV RNA 的定量取决于样本中存在的病毒颗粒数，这会受到样本收集方法、病人（如年龄、临床症状及感染阶段）等因素的影响。

【产品性能指标】

本试剂盒检测中国食品药品检定研究院的丙型肝炎病毒核酸国家参考品，阴阳性参考品符合率为 100%，最低检出限定量标准品及其梯度稀释的标准品 $10^2 \sim 10^6 \text{ IU/mL}$ 全部检测为阳性，定量范围符合质量标准。

定量检测最低检出限：不高于 15 IU/mL 。

基因分型检测 1 型、2 型和 3 型 HCV 最低检出限：均不高于 100 IU/mL 。

线性范围： $17 \text{ IU/mL} \sim 1 \times 10^8 \text{ IU/mL}$ ，相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。

精密密度：检测精密密度参考品，根据量值对数值计算变异系数（CV）， $CV (n=10) \leq 5\%$ 。

基因型检测能力：可检出基因型 1 型、2 型、3 型、4 型、5 型和 6 型，并可区分常见的 1 型和 2/3 型 HCV。

本试剂盒与乙型肝炎病毒（HBV）、人类免疫缺陷病毒（HIV）、单纯疱疹病毒（HSV）、Epstein-Barr 病毒（EBV）、人巨细胞病毒（HCMV）、甲型流感病毒 H1N1、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌等病原体感染样本无交叉反应。含有人白蛋白（75 g/L）、游离血红蛋白（120 g/L）、EDTA（2 g/L）、肝素钠（20 g/L）、胆红素（35 $\mu\text{mol/L}$ ）、甘油三酯（10 mmol/L）和总 IgG（17 g/L）的样本对检测结果无干扰影响。

【注意事项】

1. 本试剂盒仅用于体外诊断。
2. 检测前请仔细阅读产品说明书。
3. 实验中所用器具均应经过灭菌处理。
4. 不合理的样本采集、转运、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。
5. 核酸提取应在样本采集后尽快进行，以避免 HCV RNA 降解；不能尽快进行的，应参照【样本要求】保存。
6. 本试剂盒说明书中所述的性能指标是在搭配本公司生产的核酸提取及纯化试剂（产品型号：体液 RNA）情况下，验证所得。
7. 配制反应体系过程中若需标记，请在试管架或离心机管架上标记，不要直接标记在离心管上。
8. 由于本试验涉及到病毒 RNA 的提取及 PCR 扩增，应小心避免试剂盒扩增反应混合物受到污染。推荐定期监测实验室污染。
9. 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员。
10. 使用本试剂盒时，应严格按照说明书要求进行操作；样本处理和加样等步骤须在生物安全柜或其他基本防护设施中进行，并遵循临床基因扩增实验室的技术要求规范操作。

【参考文献】

1. Andonov, A., and R. K. Chaudhary. Subtyping of hepatitis C virus isolates by a line probe assay using hybridization. Journal of clinical microbiology, 1995, 33(1): 254-256.
2. Ling L, Tatsunori N, Yunshao H, et al. Hepatitis C virus genotype distribution in China: Predominance of closely related subtype 1b isolates and existence of new genotype 6 variants. Journal of Medical Virology, 2005, 75: 538-549.
3. Simmon P. Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus-15 years on. Journal of general virology, 2004, 85:3173-3188.
4. 刘金涛. 丙型肝炎病毒（HCV）的检测及应用探究. 国际病毒学杂志, 2008, 15(5):157-162.
5. 赵璐, 冯悦, 夏雪山. HCV 基因型的差异流行与进化. 遗传, 2012(34): 666-672.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 复星诊断科技（上海）有限公司

住所: 上海市宝山区城银路 830 号

联系方式: 电话: (021) 60765888 传真: (021) 60765999 邮编: 200444

售后服务单位名称: 复星诊断科技（上海）有限公司

联系方式: 电话: 4006196063 传真: (021) 60765999

生产地址: 上海市宝山区城银路 830 号

生产许可证编号: 沪药监械生产许 20020886 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20193400216

【说明书核准及修改日期】2019 年 3 月 29 日核准/2022 年 08 月 03 日修改