

人类免疫缺陷病毒1型（HIV-1）核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法) 说明书

【产品名称】

通用名称：人类免疫缺陷病毒1型（HIV-1）核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】48 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测HIV-1感染者血清或血浆样本中的人类免疫缺陷病毒（1型）核酸(HIV-1 RNA)。

试剂盒通过对HIV-1感染者血清或血浆中人类免疫缺陷病毒（1型）核酸(HIV-1 RNA)基线水平和变化情况的监测，用于评估抗病毒治疗的应答和治疗效果的监测。检测结果不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结果对病情进行综合分析。

本试剂盒不用于HIV的血源筛查。

【检验原理】

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，主要通过性接触、血液感染、血液制品感染或母婴传播。我国是世界上艾滋病发病发展较快的国家之一，而目前尚未研发出有效的预防艾滋病的疫苗和治愈药物。所以早期诊断和筛查是控制其发生的主要手段。本试剂盒采用荧光定量PCR技术，选择HIV-1基因组高度保守的特异基因作为靶序列进行体外扩增和定量检测。与其他检测方法相比，HIV核酸定量检测更加敏感、快捷、准确。

本试剂盒使用全程非竞争性内标，可以监测核酸提取和扩增检测的全过程，同时避免假阴性发生。检测探针与内标探针均带有荧光报告基团和淬灭基团，通过标记不同颜色的荧光基团来区分，在不同的波长区独立检测。

本试剂盒采用工作标准品法定量。扩增曲线指数增长时的PCR循环数(Ct)与起始模板浓度(C)的对数(LogC)呈线性关系，通过对已知浓度的系列工作标准品的检测，仪器自动拟合出关于Ct与LogC的标准曲线及方程，待测样本根据检测Ct值，由软件自动获得其起始浓度。

本试剂盒扩增体系采用UNG-dUTP防污染措施，利用UNG将反应管中可能存在的扩增产物污染充分降解，以排除由此引起的假阳性检测结果。

【主要组成成分】

1. 试剂盒成分

类 别	试剂名称	规 格	主要组份
扩 增 检 测 试剂	[HIV-1 PCR 反应液]	480μL×1支	含引物、荧光探针、dNTPs混合液
	[HIV-1 PCR 酶混合物]	240μL×1支	含逆转录酶、Taq酶、UNG酶
质 控 品	[HIV-1 内标]	480μL×1支	含人工制备内标RNA假病毒
	[HIV-1 强阳性对照]	400μL×1支	含人工制备的HIV-1 RNA假病毒；靶值：1.0×10 ³ IU/mL~1×10 ⁷ IU/mL
	[HIV-1弱阳性对照]	400μL×1支	含人工制备的HIV-1 RNA假病毒；靶值：1.0×10 ² IU/mL~1×10 ⁴ IU/mL
	[HIV 阴性对照]	400μL×1支	含已灭活的HIV RNA检测为阴性的血浆
定 量 标准品	[HIV-1 工作标准品①]	400μL×1支	含人工制备HIV-1 RNA假病毒
	[HIV-1 工作标准品②]	400μL×1支	
	[HIV-1 工作标准品③]	400μL×1支	
	[HIV-1 工作标准品④]	400μL×1支	

备注：

- 试剂盒内的生物样本已灭活处理，但并不排除含有潜在的传染性物质，应严格按照《临床基因扩增检验实验室管理办法》，在符合要求的实验室内操作；
 - 不同批号产品的成分之间不得混用或互换；
 - 定量标准品（HIV-1 工作标准品①、HIV-1 工作标准品②、HIV-1 工作标准品③、HIV-1 工作标准品④）溯源至人类免疫缺陷病毒核糖核酸（HIV-1 RNA）国家参考品，具体浓度请参考试剂盒内标示量。
2. 必要但可能需要单独购买的器材：
- 移液器；
 - 与移液器配套的无RNA酶和DNA酶带滤芯Tip头；

- 3) 无RNA酶和DNA酶的PCR反应管；
- 4) 无RNA酶和DNA酶的离心管；
- 5) 台式振荡器；
- 6) 台式离心机；
- 7) 核酸提取试剂(产品名称：核酸提取试剂；生产商：山东见微生物科技有限公司；备案号：鲁济械备20170025号；货号：EMMR001A和EMMR001B)。

【储存条件及有效期】

试剂盒应避光密闭于-18℃以下保存，有效期为12个月。

尽量避免反复冻融，最大允许冻融次数为6次。

生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

核酸扩增仪：ABI 7500、Roche Light Cycler 480、SLAN 实时荧光定量PCR仪器。

【样本要求】

1. 样本采集：按照临床检测相关要求进行样本采集。

- 1.1 血清样本：受检者静脉血注入无菌采血管或离心管中，室温或2~8℃静置2小时后，待测样本自行析出血清，或直接室温2000~4000×g离心10分钟获取上清，转移上清(注意勿吸入红细胞)至一无菌离心管中，即为血清样本。
- 1.2 血浆样本：受检者静脉血注入分离管中（抗凝剂可为枸橼酸钠或EDTA，不可使用肝素类抗凝剂。推荐带有惰性分离胶的血浆分离管），室温或2~8℃静置2小时后，室温或低温2000~4000×g离心10分钟获取血浆，转移上清（注意勿吸入红细胞）至无菌样本管中，即为血浆样本。

2. 样本存放：采集的未分离全血样本必须保存于2-30℃，并在采集后24小时内完成离心以获取血清或血浆。新鲜血清或血浆样本在2-8℃条件下可稳定保存10天，在室温（10-30℃）条件下可稳定保存5天，如血清或血浆样本无法在相应保存期限内检测，应保存于-18℃以下，在该温度下样本可稳定保存12个月，检测前取出恢复至室温。如血清或血浆样本需长期保存，建议保存在-80℃以下，在该温度下样本可稳定保存12个月。全血样本不能进行冻融，血清和血浆样本也应避免反复冻融，最大允许反复冻融次数为5次。

3. 样本运输：采集样本运输应遵循《可感染人类的高致病性病原微生物菌（毒）种或样本运输管理规定》、《病原微生物实验室生物安全管理条例》等相关规范进行管理。未经分离的全血样本必须于2-25℃保存温度下进行运输，且在采集后24小时内完成离心。血清或血浆样本可在2-8℃或-18℃以下的运输保存温度下进行运输。

【检验方法】

1. PCR试剂准备(在试剂准备区进行)

1.1 取出试剂盒中 [HIV-1 PCR 反应液] 和 [HIV-1 PCR 酶混合物]，待室温完全融化成液态后，振荡混匀，低速离心数秒。

1.2 每次实验的扩增反应数= [HIV-1 强阳性对照]、[HIV-1 弱阳性对照]、[HIV 阴性对照]、[HIV-1 工作标准品①]、[HIV-1 工作标准品②]、[HIV-1 工作标准品③]、[HIV-1 工作标准品④] +待测样本数，按比例（[HIV-1 PCR 反应液]10μL/测试+[HIV-1 PCR 酶混合物]5μL/测试）取相应量的[HIV-1 PCR 反应液] 和 [HIV-1 PCR 酶混合物]，充分混匀成PCR-mix，振荡混匀后瞬时离心备用。

1.3 往每个PCR反应管中加入15μL PCR-mix；然后将装有PCR-mix的反应管转移至样本处理区。

2. 核酸提取(在样本处理区进行)

2.1 取出试剂盒中 [HIV-1 强阳性对照]、[HIV-1 弱阳性对照]、[HIV 阴性对照]、[HIV-1 工作标准品①]、[HIV-1 工作标准品②]、[HIV-1 工作标准品③]、[HIV-1 工作标准品④]，在室温完全融化成液态后，震荡混匀，低速离心数秒。

2.2 取出试剂盒中 [HIV-1 内标]，在室温完全融化成液态后，震荡混匀，低速离心数秒。

2.3 将2.1中所列每个项目及待测样本各取200μL，加入对应编号的96孔深孔板的相应孔位，随后在每个待处理孔位加入10μL [HIV-1 内标]，按照山东见微生物科技有限公司生产的核酸提取试剂说明书进行核酸提取操作，提取所得模板用于下一步扩增。

3. PCR反应体系构建(在样本处理区进行)

按照实验设定的PCR反应管布局，在每个装有PCR-mix的反应管中分别加入各自对应的模板35μL。将反应管盖上管盖或封膜，低速离心数秒，转移到扩增检测区。

4. PCR扩增检测(在扩增检测区进行)

- 4.1 将反应管按照实验布局放入荧光PCR扩增仪进行扩增检测。
4.2 循环参数设定: (请参照仪器的操作软件进行设置)

步骤	温度(°C)	时间	循环数
1	逆转录	50	15 min
2	预变性	95	2 min
3	变性	95	5 sec
	退火、延伸及检测荧光	60	30 sec
步骤3中60°C时荧光检测, 检测通道: HIV-1 RNA(FAM)、内标 (HEX或VIC), 可选择ROX为参比荧光。			

4.3 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、类型及工作标准品参数(详见设备说明书, 注意试剂盒内定量标准品标签标示浓度, 其参数每批可能不同, 不同批次请勿混用)。

5. 检验结果

根据各类仪器的软件进行定量分析, 得到各样本的检测结果。(基线建议选取3~10或6~15, 或根据不同的仪器、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; 还可由仪器自动选择, 优先考虑仪器自动选择)

6. 试验成立条件

- 6.1 定量标准品检测结果均为阳性, 且线性相关系数 $|r| \geq 0.980$;
6.2 HIV 阴性对照: 检测结果应为阴性, 且内标Ct值 ≤ 40 ;
6.3 HIV-1弱阳性对照: 检测结果介于 1.0×10^2 IU/mL ~ 1.0×10^4 IU/mL;
6.4 HIV-1强阳性对照: 检测结果介于 1.0×10^5 IU/mL ~ 1.0×10^7 IU/mL;
6.5 应同时满足上述所有条件, 实验判断为有效, 否则实验无效。

【检验结果的解释】

检测结果	结果判定
无数值, 且内标无数值或内标Ct值 >40	检测可能受到抑制, 需要复测。
无数值, 且内标Ct值 ≤ 40	未检出HIV-1 RNA或标本中HIV-1 RNA含量低于检测极限值。
<50 IU/mL且有数值	低于试剂盒定量检测线性范围下限, 所测定量结果仅供参考, 报告上注明 <50 IU/mL, 检出HIV-1 RNA。
50 IU/mL ~ 1.0×10^8 IU/mL	直接报告阳性及相应的病毒载量。
$>1.0 \times 10^8$ IU/mL	高于试剂盒定量检测线性范围上限, 所测定量结果仅供参考, 报告上注明 $>1.0 \times 10^8$ IU/mL。若需准确定量, 可根据检测结果, 将该样本用HIV-1 RNA阴性血清或血浆稀释至线性范围后复测。

【阳性判断值】

通过对临床HIV-1 RNA阴性样本和HIV-1 RNA阳性样本进行受试者工作特征 (ROC) 曲线分析, 包括对检测限附近样本进行评估, 认为本试剂盒的阳性判断值为Ct值45。

FAM检测Ct值有数值 (<45) 为阳性; FAM检测Ct值无数值或为45, 且VIC/HEX检测Ct ≤ 40 为阴性或低于检测限。

【检验方法的局限性】

- 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。
- 可靠的结果取决于样本采集、转运、储存及处理程序。
- 该试剂仅限于规定的样本类型及适用机型。
- 被引物或探针覆盖的病毒基因组高度保守片段内部发生的突变可能会导致检测到的病毒含量偏低或者检测不到病毒。
- HIV-1 RNA的定量取决于样本中存在的病毒颗粒数, 而这会受到样本收集方法, 病人因素 (如年龄, 是否存在症状) 和/或感染阶段等因素的影响。

【产品性能指标】

- 对国家参考品检测的符合情况:
本试剂盒检测中国食品药品检定研究院的人类免疫缺陷病毒核糖核酸 (HIV-1 RNA) 国家参考品, 阴、

阳性参考品符合率均为 (8/8); 线性参考品及其梯度稀释的参考品检测结果全部为阳性, 且线性符合国家标准要求; 精密性、定量准确性、最低检测限检测结果符合国家标准要求。

2. 对企业参考品检测的符合情况:

- 阴性参考品符合率: 检测结果应全部为阴性, 阴性参考品符合率 (-/-) 应为8/8。
- 阳性参考品符合率: 检测结果应全部为阳性, 阳性参考品符合率 (+/+) 应为8/8。
- 线性: 定量检测线性范围是 50 IU/mL ~ 1.0×10^8 IU/mL, 线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。
- 定量准确性: 检测已稀释至高 (1×10^5 IU/mL)、中 (1×10^4 IU/mL)、低 (1×10^3 IU/mL) 三个水平的HIV-1 RNA灵敏度/定量参考品, 每个水平的样品完成3个重复检测, 其检测结果 (lg IU/mL) 绝对偏差应不超过0.5。
- 最低检测限: ≤ 30 IU/mL。
- 精密性: 检测 1×10^4 IU/mL和 1×10^3 IU/mL两个水平的企业HIV-1 RNA灵敏度/定量参考品, 变异系数 (CV) 应 $\leq 5\%$ (n=10)。
- 对不同基因型的覆盖: 检测HIV-1基因型国际参考盘的M 组 (A, B, C, D, AE, F, G, AG), O组基因型, 结果均为阳性, 且定量值与标准值的绝对偏差范围在0.5个对数数量级内。
- 特异性:
 - 交叉反应: I / II 型人类嗜T细胞病毒、巨细胞病毒、EB病毒、甲型流感病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、单纯疱疹病毒、水痘-带状疱疹病毒 (VZV)、人乳头瘤病毒均无特异性扩增。
 - 干扰物质: 样本中血红蛋白低于 200 mg/dL, 甘油三酯水平低于 3300 mg/dL, 胆红素水平低于 20 mg/dL, EDTA水平低于 12 mg/mL, 白蛋白低于 15 mg/mL对本试剂HIV-1 RNA的定量检测没有干扰。
 - 药物影响: 常用的治疗药物, 如阿德福韦、替比夫定、拉米夫定、齐多夫定、司它夫定、替诺福韦、恩替卡韦、奈韦拉平、依非韦伦、利巴韦林、洛匹那韦、伐昔洛韦、阿昔洛韦、阿奇霉素、克拉霉素、环丙沙星在峰值血药浓度时不会对本试剂HIV-1 RNA定量结果产生影响。

【注意事项】

- 本试剂盒为体外诊断试剂, 仅供体外诊断。
- 肝素抑制PCR反应, 以血浆作为待测样本时避免使用肝素抗凝管。
- 实验时应穿工作服, 戴一次性手套(经常替换手套), 使用一次性用品。
- 试剂盒各组份使用前请充分融化并摇匀, 离心管内的微量试剂需离心数秒后使用。
- 样本采集及储存过程避免样本间交叉污染, 在样本处理阶段建议使用生物安全柜。
- 操作过程中用到的生物安全柜、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备推荐用75%乙醇进行消毒, 操作过程中用到的工作台面推荐使用0.1~1%的次氯酸钠溶液消毒。
- 废弃吸嘴弃于含有10%次氯酸钠的废液缸中, 以防止污染。
- 试剂盒内阴性对照或其它可能含有人源物质的组分, 虽已经通过了HBsAg、HIV1/2抗体、HCV抗体项目的检测, 使用PCR技术未检测到HBV DNA、HIV-1 RNA、HCV RNA, 但截至目前, 没有任何一项检测可以确保绝对安全, 故仍应将这些组分作为潜在传染源对待。
- 实验室管理应严格按照国家有关分子生物学实验室、临床基因扩增实验室的管理规范执行。实验人员必须进行专业培训; 实验过程应分区进行 (试剂准备区、样本处理区、扩增检测区), 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区各阶段用品不得交叉使用; 各区间人员流动及空气流向应有严格要求, 最大限度避免交叉污染; 实验用消耗品 (如离心管、吸头等) 应有合理的清洁和质检程序, 避免污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。
- 对于检测结果为阴性的样本, 应确定HIV内标的扩增信号是否正常, 以避免假阴性结果; 对于检测结果为阳性的样本, HIV内标的扩增信号可不予考虑。
- 本试剂盒检测结果可以用拷贝/mL、Log (拷贝/mL)、国际单位 (IU) /mL、或Log[IU/mL]报告; (1 IU ≈ 0.58 拷贝, 1 拷贝 ≈ 1.74 IU)

【参考文献】

- [1]. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983;220:868-71.
- [2]. Mulder J, McKinney N, Christopher C, et al. Rapid and simple PCR assay for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma: application to acute retroviral infection. J Clin Microbiol 1994;32:292-300.
- [3]. Yen-Lieberman B, Brambilla D, Jackson B, et al. Evaluation of a quality assurance program for quantitation of human immunodeficiency virus type 1 RNA in plasma by the AIDS clinical trials group virology laboratories. J

Clin Microbiol 1996;34:2695-701.

【基本信息】

企业名称：山东见微生物科技有限公司

注册地址：山东省济南市高新区大正路1777号生物医药园中小企业产业化基地5号楼101厂房和6号楼105厂房

生产地址：山东省济南市高新区大正路1777号生物医药园中小企业产业化基地5号楼101厂房和6号楼105厂房

医疗器械生产许可证编号：鲁食药监械生产许20190015号

联系电话：0531-82315138

公司网址：www.geneway-bio.com

售后服务单位：山东见微生物科技有限公司

注册地址：山东省济南市高新区大正路1777号生物医药园中小企业产业化基地5号楼101厂房和6号楼105厂房

联系电话：0531-82315138

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20223401225

【说明书核准日期及修改日期】 2022 年 9 月 9 日