



安倍生物医学亚太私人有限公司

丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检测试剂盒 (免疫印迹法)

HCV BLOT 3.0 使用说明书

MAD 0013-CHN-4

产品型号：18人份/盒－11139-018
36人份/盒－11139-036

【产品名称】

- 通用名称：丙型肝炎病毒 (HCV) 抗体检测试剂盒 (免疫印迹法)
- 英文名称：HCV BLOT 3.0

【包装规格】

18人份/盒，36人份/盒。

【预期用途】

本产品用于定性检测人血清或血浆中的丙型肝炎病毒抗体。

安倍生物医学亚太私人有限公司 (MP Biomedicals Asia Pacific) 生产的丙型肝炎病毒(HCV) 抗体检测试剂盒 (HCV BLOT 3.0) 是对人血清或血浆中的丙型肝炎病毒抗体进行体外检测的定性酶免疫测定方法。该试剂盒做为特异性更高的补充确认试验，用于对筛查方法 (如:酶联免疫吸附试验) 检测重复呈阳性的样本进行确认。

【检验原理】

硝酸纤维素膜条上含有来自HCV基因组中核抗原、NS3、NS4和NS5区的重组蛋白条带。重组蛋白以谷胱甘肽转移酶融合表达，因此膜上也包含一条谷胱甘肽转移酶质控带，用以提示个别样本对谷胱甘肽转移酶的反应性。膜上还包含一条IgG和一条抗-IgG质控带。膜条与稀释的血清或血浆样本一起孵育。如果样本中存在HCV的特异性抗体，则

会和膜上的HCV蛋白结合。膜经过洗涤去除未结合物质后，与碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体 (酶结合物) 一起孵育。酶结合物会与HCV抗体结合，在膜条上形成抗原-抗体复合物。通过洗涤去除未结合的酶结合物。加入底物液5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐(BCIP)/硝基四氮唑(NBT)，在膜上可形成肉眼可见的蛋白反应条带。

【主要组成成分】

1. 硝酸纤维素膜 (试剂膜条) 含有4条HCV结构和非结构重组蛋白条带。2条附加的血清质控带 (抗-人IgG和人IgG) 和一条谷胱甘肽转移酶质控带。	18或36条两种
2. 阴性对照 灭活后的正常人血清。HBsAg、Anti-HIV-1/2和Anti-HCV检测均呈阴性。含硫柳汞和叠氮钠作为防腐剂。	1管80μl
3. 阳性对照 灭活后的高滴度抗-HCV阳性血清。HBsAg、Anti-HIV-1/2和Anti-HTLV-I/II检测均呈阴性。	1管80μl
4. 浓缩贮存缓冲液 (10x) 含经高温灭活的山羊血清。含硫柳汞作为防腐剂。	1瓶20ml
5. 浓缩洗膜缓冲液 (20x) 含Tween 20的Tris缓冲液。含硫柳汞作为防腐剂。	1瓶70ml
6. 酶结合物 碱性磷酸酶标记的抗人IgG抗体。含叠氮钠作为防腐剂。	1管120μl
7. 底物液 5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸盐 (BCIP) 和硝基四氮唑 (NBT) 溶液。	1瓶100ml
8. 封闭粉 脱脂奶粉	10袋 每袋1g
9. 孵育板 每块板有9条板槽	2或4 块板

注意：试剂量足够4次用，不同批号的试剂盒组份不能混用。

1

试验步骤:

a. 用镊子从管中小心地取出所需的试剂膜条数量(包括检测阳性对照和阴性对照的膜条各一条)，有编号的一面向上，分别放入孵育板槽内。	—
b. 每槽内加入2ml洗膜缓冲液。	2ml
c. 在室温下 (25±3°C) 将孵育板置摇床上 (每分钟摇摆12-16次) 孵育至少2分钟，然后抽出缓冲液。	25±3°C 2分钟
d. 每槽内加入2ml封闭缓冲液。	2ml
e. 分别将20μl病人血清或阳性、阴性对照加至相应的板槽内。需小心注意不要将样本直接加至膜条上。	20μl
f. 盖好孵育板，于室温下 (25±3°C) 在摇床上孵育1小时。	25±3°C 60分钟
g. 小心打开孵育板盖，避免样本溅出，倾斜板条以便抽出板槽内的液体。每个样本都需更换抽液吸头以避免交叉污染。	—
h. 每槽内加入2ml洗膜缓冲液，置摇床上孵育5分钟后抽出液体。每个板槽重复洗涤3次。	3 x 2ml 5分钟
i. 每槽内加入2ml酶结合物工作溶液。	2ml
j. 盖好孵育板，于室温下 (25±3°C) 在摇床上孵育1小时。	25±3°C 60分钟
k. 吸出板槽内的酶结合物。按步骤h的方法进行洗涤。	—
l. 每槽内加入2ml底物液。	2ml
m. 盖好孵育板，于室温下 (25±3°C) 在摇床上孵育15分钟。	25±3°C 15分钟

n. 小心打开孵育板盖，抽出底物液，以蒸馏水洗涤3次以终止反应。(如果洗涤不够充分，背景会比较深)。	3 x 2ml
o. 用镊子小心取出试剂膜条，置于滤纸上，并覆以滤纸吸干水份。也可将试剂膜条放在板槽内待其自然干燥。	—
p. 将试剂膜条粘贴在工作表格 (非吸水纸) 上，记录观察结果 (见“检验结果的解释”)。不要在显色区粘贴胶带纸。试剂膜条可置于暗处保存。	—

注：所有孵育应在摇动平台上或全自动蛋白印迹仪 (推荐使用AutoBlot System 20) 进行。

试验步骤概要		
试剂	数量	孵育时间
硝酸纤维素膜	1	—
1 x 洗膜缓冲液	2ml	2分钟
1 x 封闭缓冲液	2ml	—
样本	20μl	60分钟
1 x 洗膜缓冲液	3 x 2ml	3 x 5分钟
酶结合物工作溶液	2ml	60分钟
1 x 洗膜缓冲液	3 x 2ml	3 x 5分钟
底物液	2ml	15分钟
蒸馏水	3 x 2ml	—

试剂量需求表							
试剂	所用试剂膜条的数量						
	3	6	9	15	20	27	36
1 x 洗膜缓冲液 (ml)	60	100	140	240	300	400	520
1 x 封闭缓冲液 (ml)	20	40	60	80	100	120	160
酶结合物工作溶液 (ml)	11	17	23	35	45	59	77
底物液 (ml)	11	17	23	35	45	59	77
封闭粉 (g)	1	2	3	4	5	6	8

3

【储存条件及有效期】

2~8°C储存，有效期24个月。

- 在不使用时，应将HCV BLOT 3.0试剂盒及其组分储存在2-8°C环境中。
 - 在失效期前，储存在2-8°C环境中的试剂组份和试剂膜条是稳定的，试剂不能冰冻。
- A. 试剂膜条
- 避免试剂膜条不必要地暴露于光线下。
- B. 试剂
- 用原装的瓶子盛装试剂，盖紧盖子储存。
 - 在冷藏的情况下取用试剂，用完后尽快将试剂放回到2-8°C储存。
 - 底物液在2-8°C储存时，可能会有沉淀形成，但不影响试剂盒的正常使用。

注意：避免底物液不必要地暴露于光线下。

生产日期及失效日期见标签。

【适用仪器】

- 去离子水或蒸馏水。
- 一次性手套。
- 摇床(每分钟12-16次，摆动角度5-10度，以均匀地清洗膜条)或全自动蛋白免疫印迹仪(推荐使用型号AutoBlot System 20)。
- 移液器和一次性加样头。
- 抽液机和含次氯酸钠的废液瓶。
- 56°C水浴锅(非必需)。
- 消毒用次氯酸钠。

【样本要求】

本试剂盒只可对人血清或血浆样本进行检测。

血浆可以用草酸钾，柠檬酸葡萄糖，EDTA或柠檬酸钠抗凝，但不能用肝素抗凝，因为它和HCV的核抗原会发生非特异性反应。样本在储存前，应离心除去血凝块和血细胞。

如果样本在采集后的7天内检测，可于2-8°C保存。如果超过7天，则应保存在-20°C或更低的温度下。最好使用澄清、不溶血的样本。脂血、黄疸、被颗粒物或细菌污染的样本在使用前应先进行过滤(0.45μm) 或离心处理。

可以对样本进行灭活处理，但灭活步骤并非必需。

灭活步骤如下：

- 拧松样本容器的盖子。
- 用水浴将样本灭活，56°C，保持30分钟。
- 待样本冷却后，拧紧盖子。
- 样本在检测前可冰冻保存。

注意：在检测前应避免反复冻融样本。

【检验方法】

试剂配制

- 洗膜缓冲液
 - 洗膜缓冲液须在使用前新鲜配制。
 - 将1体积的浓缩洗膜缓冲液 (20x) 加入到19体积的蒸馏水中，充分混匀。
- 封闭缓冲液
 - 封闭缓冲液须在使用前新鲜配制。
 - 1体积的浓缩贮存缓冲液 (10x) 加入到9体积的蒸馏水中，充分混匀。
 - 在每20ml用上述2b步骤配制的稀释贮存缓冲液中加入1g封闭粉，充分混匀，使封闭粉完全溶解。
 - 在使用前再次搅拌。

- 酶结合物工作溶液

注：应使用聚丙烯容器来配制酶结合物工作液。

 - 酶结合物工作液须在使用前新鲜配制。
 - 以1:1000的比例配制酶结合物工作液，例如5μl的酶结合物加入到5ml的封闭缓冲液中。
- 底物液 (即用型)
 - 用洁净的加样器从瓶中直接吸取所需体积的底物液，用完后将盖子拧紧。

检验步骤

注意：

- 试验中产生的所有化学废液和试剂须抽入含有次氯酸钠的废液瓶内。
- 所有孵育步骤应在摇床上进行。
- 直接将样本加至膜条上可能会形成深色的斑点。为了避免这样的问题，应确保以下的事项：
 - 在加入封闭缓冲液后再加入样本。
 - 稍稍抬高孵育板的一端以使板槽倾斜。封闭缓冲液会流向板槽的低处。将样本加到封闭缓冲液的汇集处。在整个试验过程中应确保膜条的湿润。
 - 另一种替代方法是：不需要倾斜孵育板，而是将样本加到板槽的顶端或底部，这样即使出现黑斑，对读取结果也没有影响。

2

条带结果	试验结果
没有≥1+的条带	阴性
至少出现2条≥1+的条带或者仅出现1条≥2+的核抗原条带	阳性
只出现1条≥1+的条带，但不符合阳性的判断标准	不确定

只出现谷胱甘肽转移酶质控带应判为阴性结果。

谷胱甘肽转移酶质控带的反应度≥1+，且出现一条或多条反应度≥1+的HCV条带时，结果为不确定。

可能出现其它HCV筛查或确认试剂盒检测结果为丙型肝炎抗体阴性的样本用本试剂盒检测结果为阳性的情况，这是由于本确认试剂盒采用了独特的抗原决定簇。

【检验方法的局限性】

应严格按照说明书规定的方法进行检验。任何操作偏差将会导致异常的结果。

阴性结果不能排除接触和感染HCV的可能。不确定结果不能做为诊断HCV感染的依据。出现不确定结果的原因包括非特异性反应、既往感染或者是感染的早期。检测结果为不确定的受试者，建议在2-6个月后再重新采集样本复查，或者可用PCR作进一步的检测，以确定是否接触过HCV或有HCV感染。

另外，出现不确定结果或者检测结果与临床表现或其他有关的检测结果不符时，请参照“样本要求”检查是否使用了正确的抗凝剂。

【产品性能指标】

通过检测采自献血员、已知HCV抗体阳性患者、与HCV相关疾病患者以及与HCV无关疾病患者的样本，对HCV BLOT 3.0试剂盒的性能进行了评估。此外，评估中还检测了商品化的血清转化盘。

灵敏度

对330份ELISA检测结果为HCV抗体阳性的样本进行了研究，其中329份HCV BLOT 3.0检测为阳性，1份为阴性，检测为阴性的这份样本经确认为ELISA假阳性。经计算，本试剂盒灵敏度>99.9%。

此外，还使用了14个商品化的血清转化盘、4个商品化的低滴度或混合滴度血清盘对本试剂盒的灵敏度进行了评估。结论是本试剂盒与Chiron RIBA 3.0的性能相当。

4

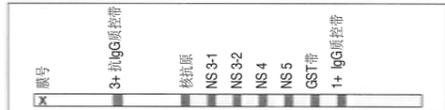
【阳性判断值】

每次检验都应包含阳性和阴性对照，为使得到的结果确认有效，必须满足以下条件：

- 质控带 (抗-IgG和IgG质控带)
这两条质控带必须出现在所有膜条上。抗-IgG条带出现提示加样步骤正常。未出现抗-IgG条带但出现IgG条带的情况提示没有加入血清样本。如果没有任何条带 (包括二条质控带) 出现，则提示操作失误或某一试剂失效。IgG质控带为1+强度的对照，抗-IgG质控带为3+强度的对照。
- 阴性对照
应只出现二条质控带 (见图1c)。
- 阳性对照
二条质控带和所有重组HCV蛋白条带都应出现。谷胱甘肽转移酶条带不应出现 (见图1b)。

【检验结果的解释】

下图为HCV BLOT 3.0试剂膜条上包被的抗原和质控蛋白。



抗-IgG和IgG质控带应出现在所有的膜条上，确定两个质控带的位置和颜色深度。IgG质控带为1+强度的对照，抗-IgG质控带为3+强度的对照。将任何出现在膜条上的条带与两个质控带进行颜色深度的比较。

HCV条带反应度	判读
1) 无条带	—
2) <1+ 质控带	±
3) =1+ 质控带	1+
4) 1+质控带<条带<3+ 质控带	2+
5) =3+ 质控带	3+
6) >3+ 质控带	4+

另外，使用HCV BLOT 3.0试剂盒能检测出BBI HCV基因型血清盘 (PHW201) 中的各个HCV基因型 (1a-6)。

特异性

共检测了200份献血员样本，结果193份为阴性，7份为不确定。另外，检测了采自急性病毒或细菌感染患者、怀孕妇女的样本，以及脂血、黄疸和溶血的样本，共280份，HCV BLOT 3.0对这些样本的检测结果显示了很高的特异性。

【注意事项】

1. 仅供体外诊断用。
2. 仅供专业人员用。
3. 请参阅说明书以及标签中关于潜在有害物的信息。

安全注意事项

 **注意：**本试剂盒内含有人源物质。现有的检测方法不能完全排除人血产品中含有污染源的可能性。

将样本、阳性对照和阴性对照作为潜在的传染物质处理。建议按实验室操作规范处理样本和各种组分。根据规定的安全程序丢弃样本和各种组分。

阳性对照和阴性对照含有硫柳汞和叠氮钠；样本稀释缓冲液和浓缩洗涤液含有硫柳汞；酶结合物含有叠氮钠。叠氮钠会与含铜或铅的水管起反应而产生具爆炸性的盐。本试剂盒中叠氮钠的含量很低，但仍建议用大量的水冲洗水管，以避免叠氮化金属盐在管道中累积。吸入、与皮肤接触或吞入叠氮化物对身体有害。

底物液中含有5溴-4氯-3吡啶磷酸盐 (BCIP) 和硝基四氮唑 (NBT)。这2种物质被欧盟指令 (ECC) 定为有害物质。吸入、与皮肤接触或吞入这两种物质对身体有害。

1. 打开试剂瓶和从瓶中移取液体时应避免微生物的污染。
2. 使用移液管时不要用嘴吸取液体。
3. 进行检测时，应穿上实验室工作服并戴上一次性手套。将用完的手套丢弃在生物危害废物袋内。随后应彻底清洗双手。
4. 强烈推荐在生物安全柜内操作本试验。
5. 不要将本产品与食品、饮料放在一起。
6. 发生意外或与试剂接触到眼睛时，应立即用大量水冲洗，并寻求医生的建议。
7. 当意外吞食污染物，或污染物与伤口或其它皮肤破损部位接触时，应立即就医。

8. 当潜在的传染性物质溅出时，应立即用吸水纸擦干，再用含1%次氯酸钠溶液的棉签处理污染区域。当酸性物质溅出时，除非先用吸水纸擦干，否则不能使用次氯酸钠处理。使用过的材料（包括一次性手套）应按照潜在的生物危害性物质处理。含有次氯酸钠的废弃物不能进行高压灭菌。
9. 所有废弃物和污染物应在121°C下高压灭菌30分钟后，才可丢弃。也可于5%次氯酸钠溶液中浸泡30-60分钟后，丢弃在生物危害袋中。
10. 次氯酸钠消毒法的最低有效浓度（终浓度）为1%。至少浸泡30分钟以确保消毒效果。
11. 不推荐重复使用孵育板。

操作注意事项

1. 应严格按照本说明书规定的检验步骤进行操作。否则会引起异常的结果。
2. 不同批号的试剂盒组成成分不能混用。使用配套的对照、酶结合物和试剂膜条才能达到最佳的效果。请只使用试剂盒提供的试剂。
3. 在移取液体时应使用无菌的移液器和加样头以避免微生物污染。微生物污染会缩短试剂盒的有效期并造成检测结果错误。
4. 每次检测时，都应使用对照，并与病人样本同步检测。
5. 玻璃器皿在使用前推荐用2M次氯酸溶液洗涤，然后用蒸馏水或去离子水彻底冲洗。
6. 仅使用试验级质量水、蒸馏水或去离子水来稀释试剂。
7. 所有试剂在使用前应充分混匀。
8. 应使用聚丙烯容器来配制酶结合物。
9. 避免将试剂储存、暴露在含有高浓度消毒气体（次氯酸盐气体）的环境中。避免在含有高浓度消毒气体的环境中进行试验。
10. 在免疫印迹试验中，使用的摇床必须是左右摆动式而不是平面旋转式的。否则试验结果会产生偏差。
11. 自动化仪器应通过验证后才能用于试验。
12. 避免使用自动除霜冰箱储存试剂和样本。

【标识的解释】

 体外诊断试剂

【参考文献】

1. Choo Q-L., et al. 1989. Isolation of acDNA clone derived from a blood-borne Non-A, Non-B viral hepatitis genome. Science; 244: 359-62.
2. Kuo G., et al. 1989. An assay for circulating antibodies to a major etiologic virus of human Non-A, Non-B hepatitis. Science; 244: 362-364.
3. Kleinman S., Alter H., Busch M., et al. 1993. Increased detection of hepatitis C virus infected blood donors by a multiple antigen HCV enzyme immunoassay. Transfusion ;32 :805-813
4. Van der Poel C. L. Reesink H., W., Schaasberg W. et al. 1990. Infectivity of blood seropositives for hepatitis C virus antibodies. Lancet; 335:558-560.
5. Colombo M., Kuo G., Choo Q-L., et al. 1989. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Italian patients with heptocellular carcinoma, Lancet; 2: 1006-8.
6. Bruix J., Barrera J., Calvert X. et al. 1989. Prevalence of antibodies to hepatitis C virus in Spanish patients with hepatocellular carcinoma and hepatic cirrhosis, Lancet; 2: 1004-6

【基本信息】

注册人/生产企业名称：
MP Biomedicals Asia Pacific Pte. Ltd.
安倍生物医学亚太私人有限公司
住 所：2 Pioneer Place, Singapore
生产地址：2 Pioneer Place, Singapore
邮政编码：Singapore 627885
电 话：0065-6775-0008
传 真：0065-6774-6146
电 邮：enquiry_ap@mpbio.com
网 址：http://www.mpbio.com

售后服务单位：
安倍医疗器械贸易（上海）有限公司
住 所：上海市张江高科技园区仁庆路309号3幢2层
邮政编码：201201
联系方式：
电 话：(021) 6240-2299
传 真：(021) 5258-6278
电 邮：support.china@mpbio.com

代理人名称：
安倍医疗器械贸易（上海）有限公司
住 所：上海市张江高科技园区仁庆路309号3幢2层
邮政编码：201201
联系方式：
电 话：(021) 6240-2299
传 真：(021) 5258-6278
电 邮：support.china@mpbio.com

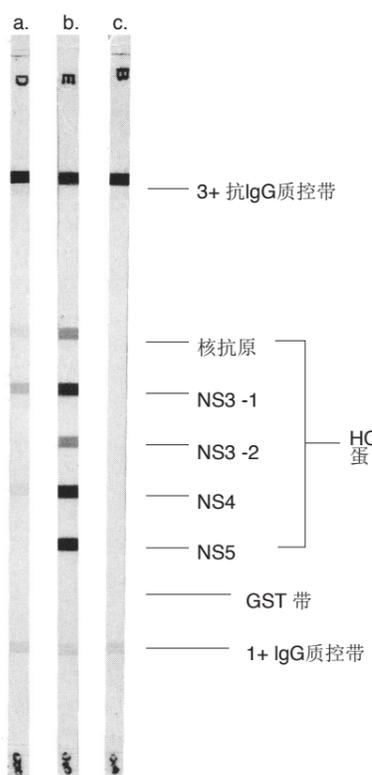
【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注进20163400272

【说明书核准及修改日期】

2019年01月01日

图 1



病毒特异性条带示意图：
a. 弱阳性血清
b. 阳性对照
c. 阴性对照
（注意：图中GST带的位置被标出，但是并未显示在膜条上，因为对照与GST带不产生反应）。

故障检查表

