

乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】32 人份/盒、96 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测血清中的乙型肝炎病毒核酸。

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus）是指引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒，也称丹氏颗粒，传统以检测血清感染标志物来判定 HBV 感染，无法对患者 HBV 感染复制程度作出判断。乙型肝炎病毒核酸 DNA 定量检测技术便于对患者体内 HBV 复制及传染性有更直接的了解。HBV-DNA 阳性作为 HBV 复制的最可靠指标，也是反映乙肝的感染状态和治疗效果的重要指标，临床上通过直接检测病毒的数量水平真实地反映病毒的感染情况，从而对 HBV 进行准确诊断、有效治疗、精确预后及新药研制等方面具有重大意义。

本试剂盒仅限于监测乙肝病毒复制水平，主要适用人群为接受抗病毒治疗的乙型肝炎患者，不得用于血源筛查。同时，本试剂盒检测结果不得作为患者病情评价的唯一标准，必须结合其临床表现及其他检测方法对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒选用乙型肝炎病毒保守基因片段设计特异引物及特异 Taqman 探针。该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合。在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，实现在全封闭反应体系中对乙型肝炎病毒核酸的自动化检测。该试剂盒中使用内质控体系，能够有效地防止假阴性结果的发生。

本试剂盒设计了一段人工合成的竞争性序列为内标模板。该模板两端为乙肝上下游引物序列，中间为非乙肝序列，与乙肝序列无交叉，内标模板扩增与乙肝扩增共用引物，内标探针选用 VIC 通道荧光标记，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组 成	主要成分	规格（32 人份/盒）	规格（96 人份/盒）
HBV 反应混合液	Tris-HCl (pH 8.9)、KCl、MgCl ₂ 、BSA、引物、荧光探针、dTTP、dATP、dGTP 及 dCTP	680μL×1	1864μL×1
HBV 临界阳性对照	灭活人源阳性血清 浓度：100IU/mL	800μL×1	800μL×1
HBV 强阳性对照	灭活人源阳性血清 浓度范围：>1.0×10 ⁵ IU/mL	800μL×1	800μL×1
阴性对照	灭活的人阴性血清	800μL×1	800μL×1
HBV 内标	质粒	70μL×1	960μL×1
Taq 酶	DNA 聚合酶及其抗体	21μL×1	384μL×1
定量标准品 1#	人阴性血清稀释的含 HBV 片段假病毒 浓度范围：(1.0~5.0)×10 ³ IU/mL	800μL×1	800μL×1
定量标准品 2#	人阴性血清稀释的含 HBV 片段假病毒 浓度范围：(1.0~5.0)×10 ⁴ IU/mL	800μL×1	800μL×1
定量标准品 3#	人阴性血清稀释的含 HBV 片段假病毒 浓度范围：(1.0~5.0)×10 ⁵ IU/mL	800μL×1	800μL×1
定量标准品 4#	人阴性血清稀释的含 HBV 片段假病毒 浓度范围：(1.0~5.0)×10 ⁶ IU/mL	800μL×1	800μL×1

注：1.定量标准品具体标值参见试剂盒内指示，不同批号试剂盒中各组分不可以互换

2.本试剂盒配套使用核酸提取试剂盒为：核酸提取或纯化试剂【陕西械备 20140007 号】

【储存条件及有效期】

-30~-20℃ 保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，但试剂反复冻融不得超过 3 次；试剂开瓶后在室温条件下放置，时间不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，模拟运输实验表明运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器为具有 FAM 和 HEX/VIC 荧光通道的 ABI 7500 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：血清
2. 采集：用一次性针筒抽取患者静脉血 1mL，置于灭菌的一次性试管中室温自然凝固（不可用肝素抗凝），或 2000~4000rpm 离心 20 分钟，吸取分离出的血清（约 0.2mL）送检。血清标本-30℃~-20℃ 保存，不宜反复冻融。

【检验方法】

1. 样本处理（样本处理区）：推荐每次检验以 200μL 样本加 2μL HBV 内标，使用西安天隆 NP 968-C 型全自动核酸提取仪【陕西械备 20150054 号】及其配套试剂盒——核酸提取或纯化试剂【陕西械备 20140007 号】进行提取，提取过程请严格按照其说明书进行。因为血清组分的复杂性，不能使用直接煮沸法提取 DNA。
2. 试剂配制（试剂准备区）：从检测试剂盒中取出 HBV 反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒，计算所需反应试剂人份数 n[n=样本数+对照数（3）+定量标准品数（4）]。每人份反应体系配制如下：

组 分	HBV 反应混合液	Taq 酶	总体积
体 积	19.4μL	0.6μL	20.0μL

按 n 人份计算上述各试剂的用量，加入一个适当容积的离心管中混匀，按 20μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样（样本处理区）：按一定顺序向反应液中分别加入 20μL 的阴性对照、临界阳性对照、强阳性对照、定量标准品和样品的洗脱液，盖紧反应管，转移至 PCR 扩增区。
4. PCR 扩增及荧光检测（PCR 扩增区）：将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增。

步 骤	循 环 数	温 度（℃）	时 间
1	1	95℃	3 分钟
		94℃	15 秒
2	45	60℃	30 秒（采集荧光）

检测荧光选择：检测样本（FAM）和内标（HEX/VIC）。

5. 质量控制：阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。阈值范围一般为 0.001~0.1 之间，强阳性对照 Ct 值应<25，临界阳性对照 Ct 值应在 30~35 之间，阴性对照 Ct 值无数且内标 Ct 值<45。标准曲线线性相关系数 |r| ≥0.98，在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

【参考区间】

根据试剂性能评估研究结果，本试剂盒的检测下限是 10IU/mL。

【检验结果的解释】

1. 阴性样本 Ct 值无数据且内标 Ct 值<45。
2. 检测样本 HBV DNA $\geq$ 10IU/mL 均判定为阳性，其中：
 - a. 检测样本测定值在 30IU/mL $\leq$ HBV DNA $\leq$ 1.0 $\times$ 10⁸IU/mL 范围内，可直接报告定量结果。
 - b. 检测样本 HBV DNA>1.0 $\times$ 10⁸IU/mL 时应做适当稀释，使其落入有效范围内。
 - c. 检测样本测定值在 10IU/mL $\leq$ HBV DNA<30IU/mL 范围内，病毒载量过低，仅作定性判定，需谨慎跟踪。
3. 检测样本测定值<10IU/mL，且内标 Ct 值<45，低于本试剂盒检测下限，建议重复检测该样本，重复测试如果测定值>10IU/mL，可报告阳性结果；如果重复测定值仍<10IU/mL，结果仅供参考；若检测过程中内标测定无数值，应当排查原因，重复对该样本检测。

【检验方法的局限性】

1. 本检验方法不能作为临床确诊的依据。对患者的临床诊治应结合其症状/体征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 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。
3. 本试剂盒的适用于使用 ABI 7500、天隆 TL 988-IV 两种荧光定量检测系统对血清中 HBV DNA 的定量检测，其他仪器尚无可靠实验数据，请谨慎使用。

【产品性能指标】

根据临床研究结果，确定如下性能指标：

1. 本试剂盒对国家标准的定量结果，符合国家标准品所给定的参考值。
2. 检测限：本试剂盒的产品检测下限为 10IU/mL，最低定量限为 30IU/mL。
3. 精密度：两例高、低阳性的样本连续重复 10 次检测，且其浓度对数值的变异系数 CV $\leq$ 5%。
4. 线性：根据性能评估实验，确定本试剂盒线性范围在 30IU/mL $\leq$ HBV DNA $\leq$ 1.0 $\times$ 10⁸IU/mL，其线性相关系数 |r| $\geq$ 0.98。
5. 亚型检测能力：本试剂盒对 HBV 病毒 A、B、C、D 亚型的国际标准品均能准确检出。
6. 分析特异性：本试剂盒与丙型肝炎病毒（HCV）、戊型肝炎病毒（HEV）、人类疱疹病毒 4 型（EB）、人巨细胞病毒（HCMV）、甲型肝炎病毒（HAV）、单纯疱疹病毒 I 型（HSV-I）、单纯疱疹病毒 II 型（HSV-II）、结核分枝杆菌（TB）、白色念珠菌及金黄色葡萄球菌无交叉反应。
7. 干扰物：500mg/mL 游离血红蛋白、18mM 甘油三酯、18mM 胆红素、170mM IgG 和 0.8mg/mL EDTA 抗凝剂，以及 300U/mL IFN- α 、4.5 μ g/mL 拉米夫定、75ng/mL 阿德福韦酯、15 μ g/mL 替比夫样本对定量结果无明显影响。
8. 在本试剂盒所规定检测范围内，本试剂盒与对比试剂定量结果经 SPSS 差异显著性分析，结果表明二者无显著差异。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测，不可用于血源筛查。
3. 试剂盒内校准品、质控品或其他可能含有人源物质的组分，虽乙型肝炎表面抗原（HBsAg）、人类免疫缺陷病毒抗体（抗-HIV1/2）、丙型肝炎抗体（抗-HCV）等项目的检测为阴性，但截至目前没有任何一项检测可确保绝对安全，故仍应将这些组分作为潜在传染源对待。
4. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
5. 实验室严格分区操作：
 - 第一区：试剂准备区——准备扩增所需试剂。
 - 第二区：样本处理区——待检测样本和对照品的处理。
 - 第三区：PCR 扩增区——PCR 扩增检测。
6. 各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验结束后立即清洁工作台。
7. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
8. 反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
9. 加样时应确保样品完全加入反应液中，不应有样品黏附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
10. 扩增完毕请立即取出反应管密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
11. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
12. 工作台及各种实验用品应定期采用 1%次氯酸钠、75%乙醇或紫外灯进行消毒。
13. PCR 反应混合液应避免光、低温保存。
14. 不同批号的试剂请勿混用，并保证在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 体外诊断试剂说明书编写指导原则
2. 临床实验室定量测定室内质量控制指南
3. 临床基因扩增检验实验室管理暂行办法
4. Heid, C.A., Stevens, J., Livak, K.J.& Williams P.M. Real-time quantitative PCR. Genome Res , 1996, 6: 986-994.
5. R Higuchi, C Fockle, G Dollinger, R Watson. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Biotechnology, 1993, 11 (9) :1026-1030.
6. JF Williams. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques, 1989, 7(7): 762-769.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司

住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式：0512-62525631

传真号码：0512-62956337

网址：www.medtl.cn

售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司

联系方式：0512-62525631

传真号码：0512-62956337

网址：www.medtl.cn

生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋（NW-07）501 室，苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋（NW-06）504 室

生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20153400379

【说明书核准日期及修改日期】2020.02.17