

乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法） 说明书

【产品名称】

乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）DNA。

乙型肝炎病毒是乙型病毒性肝炎的病原体，具有较强传染性，传播途径复杂，流行面广，发病率高等特点，可导致慢性乙型肝炎，淤胆型肝炎，严重的可导致急性肝衰竭，临床上主要表现为肝功能损害，部分患者可有黄疸。隐性感染较为常见。

目前临床上常用的 HBV 检测方法主要有酶免疫法、化学发光法检测 HBV 标志物和核酸检测 HBV DNA 方法。本试剂盒定量检测人血清或血浆样本中的 HBV DNA，主要是通过乙肝患者血中 HBV DNA 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监测。检测结果仅供临床参考，不能作为患者病情单独的评价指标，必须结合临床表现和其他实验室检测指标对患者病情进行评价，亦不能作为血液筛查 HBV 病毒的筛查试剂使用。

【检验原理】

本试剂盒基于 TaqMan 探针实时荧光 PCR 技术原理，采用一对 HBV 特异性引物和一条 FAM 染料标记荧光探针、以及一对内参特异性引物和一条 JOE 染料标记荧光探针，配以 PCR 反应缓冲液、Taq DNA 聚合酶与尿嘧啶-N-糖基化酶（UNG 酶）、脱氧核糖核苷三磷酸（dNTPs）等成分，通过荧光 PCR 反应检测 HBV DNA（FAM 通道）和内参 DNA（JOE 通道）。

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；试剂盒使用的 UNG 酶和 dUTP，可有效避免 PCR 扩增产物的污染。

【主要组成成分】

试剂盒包含的试剂组分见表 1：

表 1 试剂盒组分

组分名称	装量	每个反应中用量	组成成分
HBV 反应液	640 μL	20 μL	脱氧核糖核苷酸、引物、荧光探针、Taq DNA 聚合酶、尿嘧啶-N-糖基化酶
内参	160 μL	5 μL	假病毒
HBV 定量校准品 S1	300 μL	——	假病毒
HBV 定量校准品 S2	300 μL	——	假病毒
HBV 定量校准品 S3	300 μL	——	假病毒
HBV 定量校准品 S4	300 μL	——	假病毒
HBV 临界阳性对照	300 μL	——	假病毒
HBV 强阳性对照	300 μL	——	假病毒
阴性对照	300 μL	——	阴性血浆

- 注：1. 不同批号试剂盒中各组份不可以互换，相同批号试剂盒中各组分通用。
2. 假病毒为人工构建，不具 HBV 传染性。
3. 本试剂盒中 HBV 定量校准品、阳性对照的参数经国家标准品标化的企业参考品赋值，每批次量值不同，详见试剂盒中附页。
4. 自备实验耗材：适用规格的离心管、微量移液器等。

5. 本试剂盒推荐搭配复星诊断科技（上海）有限公司生产的核酸提取及纯化试剂（备案号：沪宝械备 20140001 号，货号：PCSYMA102）使用。

【储存条件及有效期】

试剂盒应于-20±5℃的条件下避光、密封保存，有效期 12 个月。

试剂盒开封后一周内使用，且反复冻融次数少于 3 次。试剂盒放入装有冰袋的泡沫箱中运输 6 天，温度不高于 5℃，可保持性能稳定。生产日期和失效日期见标签。

【适用仪器】

本品适用于 Life Technologies Holdings Pte Ltd 生产的实时荧光定量 PCR 仪 Real-Time PCR Instrument（型号：7500）、罗氏分子系统公司 Roche Molecular Systems, Inc. 生产的全自动荧光 PCR 分析仪（型号：cobas z 480）、上海宏石医疗科技有限公司生产的全自动医用 PCR 分析系统（型号：SLAN-96P）。

【样本要求】

1. 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 5mL，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。
2. 血浆：用真空采血管（抗凝剂为 EDTA）抽取病人静脉血 5mL，立即上下颠倒混匀不少于 8 次，4000rpm 离心 5 分钟，取分离出的血浆送检。
3. 样本保存和运输：血清和血浆样本可立即检测，也可在 2~8℃可放置 30 天，-15~-25℃可保存 12 个月，-70℃可保存 24 个月。

样本应避免反复冻融。分离后的血清和血浆样本运输过程中需采用冰壶保存，使用前需平衡至室温。

【检验方法】

1. 试剂配制
将 HBV 反应液室温融解，漩涡振荡混匀，低速离心数秒，按每管 20 μL 分装到反应管中。
2. 样本（含对照品、定量校准品）预处理
将待检样本（冻存样本需要先室温融解平衡到室温）、试剂盒对照品、定量校准品在室温融解后漩涡振荡混匀，室温低速离心后进行核酸提取。
3. 核酸提取
使用核酸提取试剂对样本进行核酸提取。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 DNA）（沪宝械备 20140001 号）并按照说明书操作。
核酸提取采用 300 μL 样本，然后在样本中加入 5 μL 内参，提取完成后，应在 10 分钟之内完成加样操作，或将核酸转移到离心管中-15~-25℃保存。提取核酸可在-15~-25℃长保存 15 个月。
4. 模板加样
按照阴性对照、阳性对照、定量校准品和待检样本的顺序，分别取核酸提取产物各 20 μL 加入反应管中，低速离心数秒后，置于实时荧光定量 PCR 仪上。
5. PCR 扩增
步骤 1：50℃反应 2 分钟，94℃保温 5 分钟，循环 1 次；
步骤 2：94℃ 10 秒→60℃ 45 秒，循环 5 次；
步骤 3：94℃ 10 秒→60℃45 秒，循环 40 次，60℃时采集 FAM、JOE 荧光通道信号。
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。

表 2 试剂盒的质量控制要求

试剂盒质控品	质控要求
HBV 定量校准品	定量标准曲线相关系数 r ≥0.980
HBV 强阳性对照	FAM 通道 Ct 值小于 22，量值符合试剂盒中附页要求
HBV 临界阳性对照	FAM 通道 Ct 值在 22-32 之间，量值符合试剂盒中附页要求
阴性对照	FAM 通道无 Ct 值

当该次检测结果有效时，应检查每个样本内参 JOE 通道 Ct 值，有效范围为 20-36，同时呈现明显的 S 型扩增曲线。

7. 结果判断

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，输入 HBV 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 HBV DNA 含量 C（IU/mL）。

【阳性判断值】

当试剂盒质控品检测结果符合质量控制要求时，该次检测有效，样本 HBV DNA 检测结果按表 3 判断。
表 3 样本 HBV DNA 检测结果解释方法

HBV DNA 含量 C	扩增曲线形状	定量结果解释
无数值	无荧光扩增信号	报告结果为“未检测到 HBV DNA”。
$C < 5 \text{ IU/mL}$	有荧光扩增信号，无 S 型扩增曲线	计算所得的结果低于最低检测限。报告结果为“低于检测限，阴性”。
$5 \text{ IU/mL} \leq C < 20 \text{ IU/mL}$	呈现明显 S 型扩增曲线	计算所得的结果低于线性范围下限，结果变异性较高因而不能认为是准确的，结果应该进行谨慎解释。报告结果为“低于定量限”。
$20 \text{ IU/mL} \leq C \leq 1 \times 10^9 \text{ IU/mL}$		计算所得的结果在线性范围内。报告定量值。
$C > 1 \times 10^9 \text{ IU/mL}$		计算所得的结果高于线性范围上限。报告结果为“大于 $1 \times 10^9 \text{ IU/mL}$ HBV DNA”。如果希望得到准确的定量结果，原始样本应使用 HBV 阴性血清或血浆稀释并再次检测，报告结果乘以稀释因子。

*若某样本内参检测 Ct 值范围不在有效范围内、或者内参和 HBV 检测均无 Ct 值，则该样本检测结果无效，应对该样本进行稀释后复检。

【检验结果的解释】

本品定量检测到乙型肝炎病毒 DNA 含量，但不能表明是否存在活性病毒；建议同时采用其它方法进行确认。

【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。

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。
检测仅限于规定的样本类型及适用机型，其它样本类型和适用机型尚未验证。
由于该试剂盒是针对病原体核酸的扩增检测，虽然在试剂盒设计时选择相对保守的片段进行扩增检测，由于病原体基因都存在变异的可能，尽管选择扩增检测的保守区发生变异的几率非常小，理论上无法完全避免这种可能。

【产品性能指标】

国家参考品检测要求：阴性参考品检测符合率 100%；阳性参考品检测符合率 100%；灵敏度参考品 L 的最低检测限不高于 5 IU/mL。

企业参考品检测要求：阴性参考品符合率 100%；阳性参考品符合率 100%；灵敏度参考品全部检出 HBV DNA 阳性，浓度对数值线性相关系数不小于 0.980。

最低检测限：5IU/mL。
线性范围：20IU/mL~ $1.0 \times 10^9 \text{ IU/mL}$ 。
精密性：检测精密性参考品，量值对数值变异系数 CV（n=10）≤5%。

基因型检测能力：可检出常见基因型 A 型、B 型、C 型、D 型。
分析特异性：对人巨细胞病毒、EB 病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、梅毒、单纯人类疱疹病毒 6 型、疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌样本无非特异扩增；检测含有过量人白蛋白（75g/L）、游离血红蛋白（20g/L）、胆红素（35μmol/L）、甘油三酯（10mmol/L）、总 IgG（17g/L）的样本，对检测结果没有产生干扰；检测普通干扰素 α（300U/mL）、聚乙二醇干扰素 α（28ng/ml）、拉米夫定（6.5μg/L）、阿德福韦酯（35ng/mL）、恩替卡韦（10ng/mL）、替比夫定（8ug/ml）的样本，药物浓度达到血药浓度，对检测结果没有产生干扰。
在试剂盒检测范围内，本试剂盒与已上市同品种对比试剂定量检测结果基本等效，无显著性差异。

【注意事项】

1. 检测前请仔细阅读本产品说明书。
2. 实验中所用器具均应经过无菌处理。
3. 核酸提取应在样本采集后尽快进行；不能尽快进行的，应参照【样本要求】保存。
4. 本试剂盒说明书中所述的性能指标是搭配本公司生产的核酸提取及纯化试剂验证所得。
5. 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。
6. 加样时，样本应完全混入反应液中，并尽快盖紧管盖，低速离心数秒，置于荧光定量 PCR 仪中。
7. 荧光阈值根据阴性值和噪声值，可在 FAM、JOE 通道分别设定。
8. 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，严格按照说明书要求进行操作。
9. 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。
10. 本试剂盒仅用于体外诊断。
11. 试剂盒内校准品、阳性对照和阴性对照含有人源物质的组分，虽然 HBsAb 和 HBeAg、抗 HCV、抗 HIV、抗 TP 检测项目结果均为阴性，但参照生物制品规程和临床实验室相关规范，仍应将这些组分作为潜在传染源对待处理。

【参考文献】

1. 戴志澄，祁国明．中国病毒性肝炎：血清流行病学调查（上卷）．北京：北京科学技术文献出版社，1997．60-71。
2. Holland PM, Abramson RD, Watson R and Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5' to 3' exonuclease activity of Thermus aquaticus DNA polymerase. Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 1991, 88:7276 - 7280.
3. Don GanemMD, Alfred M, Prince MD.Hepatitis B Virus Infection — Natural History and Clinical Consequences.N Engl J Med 2004; 350:1118-1129。
4. 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则（国家食品药品监督管理总局通告 2013 年底 3 号。）

【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20233400700

【说明书核准日期及修改日期】2023年06月01日核准