

乙型肝炎病毒核酸（DNA）检测试剂盒（荧光 PCR 法）

说明书

【产品名称】

乙型肝炎病毒核酸（DNA）检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测人血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒（HBV）DNA。

本试剂盒采用实时荧光定量 PCR 技术，适用于疑似感染者辅助诊断和接受抗病毒治疗的乙型肝炎患者，可通过对血液样本中 HBV DNA 基线水平和变化情况进行监测，检测结果可用于乙型肝炎的辅助诊断和抗病毒药物的疗效观察。检测结果不得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。本试剂不用于血源筛查。

【检验原理】

本试剂盒采用磁珠法提取血清或血浆样品中的 HBV-DNA，利用针对 HBV 核酸保守区设计的一对特异性引物，一条特异荧光探针（TaqMan 探针 5’末端标记 FAM 荧光素），配以 PCR 反应液，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现 HBV-DNA 的定量检测。

本试剂盒设置了阳性内对照（HBV 内标），HBV 内标 TaqMan 探针 5’末端标记 HEX 荧光素，通过检测内标是否正常来检测待检测样本中是否具有 PCR 抑制物，避免 PCR 假阴性。

本试剂盒设置了 UNG 酶+dUTP 防污染措施，PCR 扩增前 50℃预处理，利用 UNG 酶将可能存在的 PCR 产物污染充分降解，以排除由此可能引起的假阳性结果。

【主要组成成分】

本试剂盒包括磁珠法核酸提取试剂盒扩增反应试剂，由以下两个包装盒组成：

	序号	组分	主要成分
磁珠法核酸提取试剂	1	DNA 提取液 1	异硫氰酸胍、十二烷基硫酸钠、三（羟甲基）氨基甲烷-盐酸缓冲液、聚乙二醇辛基苯基醚
	2	DNA 提取液 2	4-羟乙基哌嗪乙磺酸、氯化钠、七水合磷酸氢二钠
	3	DNA 提取液 3	氯化钠、三（羟甲基）氨基甲烷-盐酸缓冲液、乙醇、聚乙二醇辛基苯基醚
	4	DNA 提取液 4	三（羟甲基）氨基甲烷-盐酸缓冲液
	5	DNA 提取液 5	TE 缓冲液
	6	磁珠	硅基磁珠

	7	蛋白酶 K	蛋白酶 K
扩增反应试剂	1	HBV 内标	质粒
	2	HBV 反应液	尿嘧啶-N- 糖基化酶、Taq DNA 聚合酶、Taq 缓冲液、脱氧核糖核苷三磷酸、脱氧尿嘧啶核苷三磷酸、氯化镁、引物、探针
	3	HBV 定量参考品 A	血清
	4	HBV 定量参考品 B	血清
	5	HBV 定量参考品 C	血清
	6	HBV 定量参考品 D	血清
	7	HBV 阴性对照品	血清
	8	HBV 阳性对照品	血清

备注：1）HBV 定量参考品 A～D 的具体浓度请参照试剂盒内的给定值。

2）自备试验器材：经高压灭菌（121℃，30 分钟）的 1.5 ml 离心管、0.2 ml PCR 反应管；实验室三级水；台式离心机；台式震荡混合器。

3）不同批号试剂盒中的组分不能混用或互换。

【储存条件及有效期】

试剂应避免光密闭保存，其中磁珠法核酸提取试剂置于 2～8℃下保存（蛋白酶 K 需-20±5℃保存）；扩增反应试剂置于-20±5℃保存。试剂盒有效期为 12 个月。

试剂盒在规范操作开瓶后再次使用时在有效期内可保持有效性，不影响正常使用；为了避免多次取用过程中的错误操作造成试剂损坏，请避免反复冻融；试剂盒的不同组分保持在规定温度下正常运输不会造成试剂失效。

生产日期、有效期至详见外包装。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、Stratagene Mx3000P 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1.适用样本类型：血清/血浆样本。

2.样本采集：

2.1 血清样本采集：使用无菌注射器抽取 2ml 受检者静脉血注入无菌收集管中，室温放置不要超过 4 小时，待样本析出血清或 1600rpm 离心 5~20 分钟，吸取血清于另一无菌离心管中备用。

2.2 血浆样本采集：使用无菌注射器抽取 2ml 受检者静脉血注入含有 EDTA 或枸橼酸钠抗凝剂的无菌收集管中，1600rpm 离心 5~20 分钟，吸取血浆于另一无菌离心管中备用。

3.样本保存和运送：

经上述处理后的待测样本可立即用于检测，若不立即检测，可在 2~8℃保存 72 小时，-20±5℃保存（3 个月），

长期保存请置于-70℃以下，为了避免多次取用过程中的错误操作造成样本损坏，请避免反复冻融；样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1.试剂配制（在试剂准备区进行）

1.1 取出两个包装盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温，摇晃均匀后备用；提取液如出现沉淀，可放置 37℃水浴溶解后混匀备用。

1.2 根据待测样本、阴性对照、阳性对照以及定量参考品 A~D 数量，按比例（DNA 提取液 1 270μl/人份+增强剂 30μl/人份、DNA 提取溶液 2 100μl/人份+HBV 内标 1μl/人份）取相应量的 DNA 提取液 1 和增强剂、DNA 提取溶液 2 及 HBV 内标，充分混匀后为 DNA 提取液 1mix、DNA 提取溶液 2-mix，瞬时离心 5 秒后备用。

1.3 将上述准备好的试剂转移至样本处理区，待用。

1.4 反应液分装：将反应体系按 30μl/管分装至 PCR 反应管或者反应板中。

2.样本处理（在样本处理区进行）

2.1 阴性对照、阳性对照与定量参考品需与待测样本同步处理。

2.2 取足量 1.5ml 灭菌离心管，标记好待测样本号、阴性对照、阳性对照及定量标准品 A~D，每管加入 300μlDNA 提取液 1mix、20μl 蛋白酶 K 、10μl 磁珠、100μl DNA 提取液 2-mix、200μl 待测样本或阴性对照品、阳性对照品、定量参考品 A~D；盖紧管盖，震荡混匀 10 秒，室温颠倒混匀 10 分钟。

2.3 瞬时离心后将离心管置于磁力架上，2 分钟后吸出溶液丢弃。

2.4 每管加入 550μl DNA 提取液 3，震荡混匀 5 秒，瞬时离心 5 秒后将离心管再次置于磁力架上，2 分钟后吸出溶液丢弃。

2.5 每管加入 600μl DNA 提取液 4，震荡混匀 5 秒，瞬时离心 5 秒后将离心管置于磁力架上，2 分钟后吸出溶液丢弃；室温开盖放置 2 分钟吸走管内残液。

2.6 每管加入 50μl DNA 提取液 5，反复吹打液体，55℃温浴 10 分钟，期间颠倒混匀 4 次，置于磁力架吸附 2 分钟，将液体转移到新的离心管中备用。

3.加样（操作区域：样本处理区）

分别取已处理好的样本、阴性对照品、阳性对照品、定量参考品 A-D 各 20μl 分别加到装有反应体系的 PCR 管或者 PCR 反应板中。盖上管盖离心数秒转至扩增检测区。

4.PCR 扩增（操作区域：PCR 扩增与分析区）

4.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，按对应顺序设置阴性对照品、阳性对照品、定量参考品 A~D 以及待测样本，并设置样本名称及定量参考品浓度。

4.2 荧光检测通道选择（以 ABI 7500 仪器为例）：

- 1) 选择 FAM （Reportere: FAM, Quencher: None）检测通道；
- 2) HBV 内标选择 HEX 或 VIC 通道检测（Reporter: VIC, Quencher: None）；

3) 参比荧光（Passive Reference）设置为 None。

4.3 循环参数设定：

ABI、Stratagene 系列仪器参数设置				
步骤		温度	时间（分：min，秒：s）	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2min	1
2	Taq 酶活化	95℃	5min	1
3	变性	95℃	15s	45
	退火，延伸，荧光收集	60℃	45s	
4	仪器冷却	25℃	10s	1

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

5.结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置）

反应结束后自动保存结果，对 HBV 的曲线和相应 HBV 内标的曲线进行分别分析。根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以设在 3~15、End 值可以设在 5~20，调整阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analyze 进行分析，使各项参数符合下述“6.质量控制”的要求，然后到 Plate 窗口下记录定量结果。

6.质量控制：

6.1 HBV 阴性对照：无 Ct 值显示；HBV 内标检测为阳性，且 16<Ct<40。

6.2 HBV 阳性对照：检测浓度值约为 10⁴IU/ml，HBV 内标检测为阳性，且 16<Ct<40。

6.3 HBV 定量参考品 A-D：均检测为阳性，且标准曲线相关系数|r|≥0.980，HBV 内标检测为阳性，且 16<Ct<40。

6.4 以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行。

【参考区间】

通过参考值的研究实验确定本试剂盒的定量上限为 2×10⁹IU/ml，定量下限为 300IU/ml，检测限为 30IU/ml；内标 Ct 参考值（16<Ct<40）。

【检验结果的解释】

- 1.对于测定值在 300IU/ml~2×10⁹IU/ml 之间的样本，报告相应的测定结果。
- 2.对于测定值>2×10⁹IU/ml 的样本，报告注明>2×10⁹IU/ml；若需要确定精确结果，可将血清 1000 倍稀释，使其拷贝数落在 300IU/ml~2×10⁹IU/ml 范围内，再重新进行检测，结果以稀释倍数进行校准。
- 3.对于 30 IU/ml≤测定值<300IU/ml 的样本，同时，内标检测为阳性且 Ct<40，标明病毒载量低，测定值仅供参考；如果样本检测出现 40≤Ct<45 的情况，建议重复检测 2 次，Ct≥45 时判定为阴性，至少有一次 Ct<45 可报告为阳性。
- 4.对于测定值<30IU/ml 的样本，同时，内标检测为阳性且 Ct<40，则报告 HBV DNA 含量低于试剂盒检测下限；若内

标不正常（Ct>40 或无数值），则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验。

【检验方法的局限性】

1.样本检测结果与样本的收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

2.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/特征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

3.本试剂盒仅用于血清或血浆样本检测。

【产品性能指标】

1.本试剂盒检测 HBV 核酸国家定量参考品,9 份阳性参考品 P1~P9,8 份阴性参考品 N1~N8,检测符合率为 100%，灵敏度参考品 L0~L6 阳性结果符合质量标准，定量范围符合质量标准。

2.精密度试验表明：批内和批间重复性好，测量高浓度（4×10⁷IU/ml）和低浓度（4×10³IU/ml）样本的检测结果 Ct 值的变异系数<5%。

3.本试剂盒可检测 HBV 各基因型，检测限为 30 IU/ml，定量范围为 300IU/ml-2×10⁹IU/ml，标准曲线相关系数 |r|≥0.980。

4.特异性

临床特异性：通过三家医院在临床使用中对研制的产品的主要性能指标与同类已上市产品罗氏诊断产品（上海）有限公司生产的 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test,v2.0 进行了对比试验。宝瑞源生物技术（北京）有限公司生产的乙型肝炎病毒核酸（DNA）检测试剂盒(荧光 PCR 法)中的 HBV DNA 检测的临床阳性符合率为 100%，阴性符合率为 97.96%，总符合率为 99.8%。

交叉反应：本试剂盒与甲型肝炎病毒（HAV）、丙型肝炎病毒（HCV）、人类免疫缺陷病毒（HIV）、梅毒螺旋体病毒（TP）、巨细胞病毒（CMV）、EB 病毒（EBV）、单纯疱疹病毒（HSV）、人类疱疹病毒 6 型、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌无交叉反应。

干扰物质：样本中胆红素为 50μmol/L、血红蛋白为 200g/L、甘油三酯为 1.7mmol/L、总 IgG 为 16g/L、EDTA 为 2.5mg/mL、普通干扰素 IFNα-2a 为 3000pg/ml、普通干扰素 IFNα-2b 为 3000pg/ml、普通干扰素 IFNα-1b 为 3000pg/ml、聚乙二醇干扰素α-2a 为 20ng/ml、聚乙二醇干扰素α-2b 为 500pg/ml、拉米夫定为 100ng/ml、阿德福韦酯为 100ng/ml、恩替卡韦为 10ng/ml、替比夫定为 5ug/ml，对试剂盒的检测结果没有影响。

【注意事项】

- 1.本品仅用于体外诊断，开始检测前请仔细阅读本说明书全文。
- 2.实验前请熟悉和掌握需使用的各种仪器的操作方法和注意事项，对每次实验进行质量控制。
- 3.实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所用消耗品应灭菌后一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
- 4.所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并经常替换手套以避免样品间的交

叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

5.所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化、混匀后使用。提取样本核酸前，请确保 DNA 提取溶液 1、2、3、4、5 的温度平衡至室温或以上（建议室温放置 1 小时以上或置于 30℃水浴 30 分钟以上）。

6.若实时荧光 PCR 仪仅有双通道（如 FAM 和 ROX），则可忽略内标扩增监测；若只有单通道可以忽略参比荧光 ROX 设置。

7.对于检测为阴性的样本，应确定 HBV 内标的扩增信号是否正常，以保证实验操作和检测试剂的正常使用以及抑制样本的出现，避免假阴性结果；对于阳性检测样本，HBV 内标的扩增信号可不予考虑。

8.本试剂盒仅用于血清/血浆检测，不用于血源筛查。

【标识的解释】

标识	说明
	查阅使用说明
	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- 1.《医疗器械说明书、标签和包装标识管理规定》
- 2.《体外诊断试剂注册管理办法（试行）》
- 3.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》，国食药监械[2007]240 号
- 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》

【生产企业】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

联系方式：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系方式：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

生产许可证编号：京食药监械生产许 20120027 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20153400434

【说明书批准及修改日期】

核准日期：2020 年 04 月 09 日