

乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

32 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定量检测人血清样本中的乙型肝炎病毒（HBV）DNA。

待测人群主要为接受抗病毒治疗的乙型肝炎患者。通过对乙型肝炎患者血液中 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。本检测试剂不得用于血源筛查。

【检验原理】

本产品采用 PCR-荧光探针技术，针对 HBV 核酸保守区设计特异性的引物及荧光探针，通过 PCR 反应体系中荧光信号的累积实时监测 HBV DNA 模板的变化，根据已知浓度的 HBV DNA 定量标准品，即可实现对人血清样本中的 HBV DNA 定量检测。

本产品设有阳性内对照（内标），通过内标扩增的正常与否来监控 PCR 反应的有效性，避免假阴性。同时，采用 UNG-dUTP 防污染措施，降低 PCR 扩增产物污染的可能性。

本试剂盒设有 ROX 参比荧光，用于消除操作及管间差异带来的定量结果误差，使定量结果更准确。

试剂名称	成分	规格
HBV 反应液	PCR Buffer、dNTPs、Mg ²⁺ 、DNA 聚合酶、UNG 酶、引物、探针	800μL×1
HBV 内标	人工克隆质粒、阴性人血清基质	32μL×1
HBV 定量标准品①	含 HBV 片段质粒、阴性人血清基质	500μL×1
HBV 定量标准品②	含 HBV 片段质粒、阴性人血清基质	500μL×1
HBV 定量标准品③	含 HBV 片段质粒、阴性人血清基质	500μL×1
HBV 定量标准品④	含 HBV 片段质粒、阴性人血清基质	500μL×1
HBV 阳性对照品	含 HBV 片段质粒，阴性人血清，定值范围：3.16×10 ² ~3.16×10 ³ IU/mL。	500μL×1
HBV 阴性对照品	灭活阴性人血清	500μL×1

【主要组成成分】

注：（1）不同批号试剂各组分请勿互换。

（2）HBV 定量标准品①~④的具体浓度请参照试剂盒标示值，不同批号可能有差异。

（3）实验所需但试剂盒未提供的物品：重庆中元汇吉生物技术有限公司的《核酸提取试剂盒（磁珠法）》（备案号：渝械备 20180096 号）、离心管、0.2 mL PCR 反应管（或八联 PCR 管、96 孔 PCR 板）、带滤芯吸嘴（10 μL、200 μL、1000 μL）等耗材。

【储存条件及有效期】

1. 原包装试剂在-20±5℃避光保存，有效期为 12 个月；
2. 试剂开瓶后，在 2~8℃避光保存，有效期为 10 天，反复冻融不宜超过 5 次；
3. 生产日期及失效期详见包装标签。

【适用仪器】

ABI 7500 荧光定量 PCR 仪，SLAN-96P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：血清。
2. 样本采集：用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 mL，注入无菌采血管，室温静置不超过 4 小时，待样本自行析出血清，或直接室温 1500 rpm 离心 5 分钟分离出血清，转移至 1.5 mL 离心管中备用。
3. 样本保存与运送：以上预处理样本应立即用于检测，或在 2-8℃保存，不超过 3 天；-20±5℃条件下不超过 6 个月；长期保存应置于-60℃以下，避免反复冻融。标本运输采用冰壶加冰或泡沫盒加冰密封运输。

【检验方法】

1. 核酸提取（样本处理区进行）

配套使用重庆中元汇吉生物技术有限公司的《核酸提取试剂盒（磁珠法）》（备案号：渝械备 20180096 号）。

本产品中的 HBV 内标参与提取过程，根据待测样本数，按 1μL 内标/人份，将内标溶液加入核酸提取试剂盒中的【蛋白酶 K】，混匀后进行核酸提取，具体提取过程参照说明书进行操作。

对照品、定量标准品与待测样本同步进行核酸提取操作。

2. PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 HBV 反应液置于室温融化，振荡混匀并瞬时离心后备用，按 25μL/管分装至 PCR 反应管中，将装有 HBV 反应液的反应管转移至样本处理区。

3. 加样（样本处理区进行）

使用带滤芯吸嘴分别加入 25 μL 待测样本、定量标准品或对照品，盖紧管盖，短暂离心后转移至扩增检测区避免 PCR 管产生气泡）。

4. PCR 扩增检测（扩增检测区进行）

将反应管放入荧光 PCR 仪，并记录样本编号及顺序，按下表设置 PCR 扩增参数（ABI7500 为例）：

步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50°C	2 分钟
2	预变性	95°C	5 分钟
3	变性	95°C	10 秒
4	扩增、荧光检测	58°C	30 秒
步骤 4 中 58°C 时荧光检测； 报告荧光设置：FAM, VIC 或 HEX；淬灭荧光设置：None； Passive Reference 设置：ROX			

5. 结果分析

反应结束后自动保存结果，对 HBV DNA 的曲线和相应内标曲线分别进行分析，根据分析后图像调整 Baseline 的 Start 值、End 值及 Threshold 值（Start 值范围 3~15，END 值范围 5~20），使阴性对照的扩增曲线平直或低于阈值线，点击 Analyze 获得分析结果，使各项参数符合下述“6. 质量控制”中的要求，然后到 Plate 窗口记录定量结果。

6. 质量控制程序

序号	质控品	质控标准
1	定量标准品 (①~④)	FAM 荧光通道检测 Ct 值 < 40，且标准曲线的相关系数 $r \geq 0.98$ 。
2	阳性对照品	FAM 荧光通道检测 Ct 值：28~33，定量范围为 $3.16 \times 10^2 \sim 3.16 \times 10^3$ IU/mL。
3	阴性对照品	FAM 荧光通道 Ct 值无结果，VIC 或 HEX 通道检测 Ct 值 < 40。
需一次实验中同时满足，否则视为实验无效。		

【参考值（参考范围）】

通过受试者工作曲线（ROC）确定本试剂盒阳性判断值为：目标基因检测 Ct < 45，内标 Ct < 40，产品最低检测下限为 10 IU/mL。

【检验结果的解释】

结果	判断标准
阳性	FAM 荧光通道 Ct < 45，同时： 1. 测定值在 20 IU/mL ~ 2×10^9 IU/mL，报告定量值。 2. 测定值 < 20 IU/mL，表明 HBV DNA 载量低，结果仅供参考。
阴性	FAM 荧光通道 Ct = 45 或无数值，同时 VIC 或 HEX 通道 Ct < 40，表明 HBV DNA 含量低于试剂盒检测下限。
无效	FAM 荧光通道 Ct = 45 或无数值，同时 VIC 或 HEX 通道 Ct ≥ 40 或无数值，需对样本复测。

【检验方法的局限性】

1. 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、转运及处理、以及不当的实验操作和实验环境均有可能导致假阴性或假阳性结果。
3. 产品性能仅对【样本要求】项下说明的样本采集和处理方法进行了验证，其他样本类型或样本采集、处理方法不能保证产品性能。

能。适用机型为 ABI7500，SLAN 96P。

4. 阴性结果仅说明低于产品检测限，不能完全排除感染的可能性。

【产品性能指标】

1. 阴/阳性参考品符合率：检测国家参考品中的阳性参考品，或经标化的企业阳性参考品，阳性符合率 100%；检测国家参考品中的阴性参考品，或经标化的企业阴性参考品，阴性符合率 100%。
2. 最低检出限及定量限：将国家参考品使用 HBV 阴性血清梯度稀释后进行测定，最低检出限为 10 IU/mL，定量限为 20 IU/mL。
3. 线性范围：在 $20 \sim 2 \times 10^9$ IU/mL 范围内，线性相关系数 $r \geq 0.980$ 。
4. 精密性：定量结果对数值的变异系数（CV）不大于 5%。
5. 对不同基因型的覆盖：包括 HBV A~H 型。
6. 分析特异性：本产品与甲型肝炎病毒（HAV）、丙型肝炎病毒（HCV）、人类免疫缺陷病毒（HIV）、戊型肝炎病毒（HEV）、梅毒螺旋体（TP）、巨细胞病毒（CMV）、Epstein-Barr (EB)、单纯疱疹病毒 I（HSV-I）、单纯疱疹病毒 II（HSV-II）、甲型流感病毒、肺炎链球菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等样本无交叉反应。

对可能存在的干扰情况进行验证，结果如下：

干扰物质	受试浓度	干扰情况
血红蛋白	20 g/dL	否
人白蛋白	20%	否
胆红素	17 mmol/L	否
甘油三酯	17 mmol/L	否
IgG	40 mg/mL	否
系统性红斑狼疮患者血	/	否
抗核抗体	≥ 1: 320	否
类风湿因子	300 IU/mL	否
拉米夫定	0.1 g/L	否
阿德福韦酯	0.01 g/L	否
恩替卡韦	25 μg/mL	否
替比夫定	4 μg/mL	否
IFNα	500 U/mL	否
聚乙二醇干扰素α	50 μg/mL	否

8. 对比试验研究

在 $20 \sim 2 \times 10^9$ IU/mL 浓度范围内，与已上市同类产品进行比对，经一致性分析，二者无显著差异。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 临床实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增实验室管理办法》（卫办医政发〔2010〕194 号）等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。
3. 试剂盒内校准品、质控品可能含有人源物质的组分，虽已通过 HbsAg、抗-HIV1/2、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以确保绝对安全，故仍应将这些组分作为潜在传染源对待。

【标识的解释】

标识	标识注释
	体外诊断医疗器械
	批次代码
	查阅使用说明
	生产日期
	有效期
	温度极限

【参考文献】

1. 李金明. 实时荧光 CR 技术, 第一版. 人民军医出版社, 2007.
2. Kania D, Ottomani L, Meda N, et al. Performance of two real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA detection and quantitation. [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 201(11):24.

3. Kania D, Ottomani L, Meda N, et al. Performance of two real-time PCR assays for hepatitis B virus DNA detection and quantitation. [J]. Journal of Virological Methods, 2014, 201(11):24.

4. Sun S, Meng S, Zhang R, et al. Development of a new duplex real-time polymerase chain reaction assay for hepatitis B viral DNA detection [J]. Virology Journal, 2011, 8:227.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 重庆中元汇吉生物技术有限公司

住所: 重庆市大渡口区建桥工业园 C 区太康路 6 号 30 栋第 1-4 层

联系方式:

售后服务单位名称: 重庆中元汇吉生物技术有限公司

联系方式:

全国服务热线:

传真:

邮政编码:

网址:

生产地址: 重庆市大渡口区建桥工业园 C 区太康路 6 号 30 栋第 1-4 层、重庆市大渡口区建桥工业园 C 区太康路 10 号 27-28 栋第 1-4 层

医疗器械生产企业许可证编号:

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】

