

乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA) 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 RNA (HBV-RNA) 测定试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量测定人血清样本中的乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA)。

已有研究数据显示，外周血血清中HBV-RNA可反应肝内HBV病毒的转录活性，在部分血清中HBV DNA低于检测下限的样本中，HBV-RNA仍可以被检测到。同时，在NAs治疗中，血清HBV-RNA可辅助作为HBeAg转阴的预测的指标之一，血清HBV-RNA结果为阴性，需要结合其他指标共同用于指导NAs的治疗。该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。本试剂盒不得用于HBV的血液筛查。

【检验原理】

本试剂盒 (PCR-荧光探针法) 采用磁珠法提取血清中的HBV-RNA。特异性的检测HBV-RNA的保守区域。检测试剂内含有一条反转录引物、一对特异性扩增引物以及一条荧光探针，与RT-PCR反应缓冲液，Taq酶，逆转录酶等共同配制成功RT-PCR反应液，在实时荧光定量PCR仪上进行一步法RT-PCR扩增，实现对血清样本中HBV-RNA的检测。

【主要组成成分】

	组成部分	规格/体积	主要组成成分
磁珠法核酸提取试剂	裂解液	10.0mL (1瓶)	1%SDS; 25mM Tris-HCl; 10mM EDTA
	磁珠溶液	1.0mL (1管)	Fe ₃ O ₄ 磁性颗粒
	洗液 1	15.0mL (1瓶)	400mM 氯化钠; 30mM Tris-HCl
	洗液 2	5.0mL (1瓶)	400mM 氯化钠; 0.5M 乙酸钾; 30mM Tris-HCl
	洗液 3	30.0mL (1瓶)	200mM 氯化钠; 30mM Tris-HCl
	洗脱液	2.5mL (1瓶)	10 mM 氯化钠; 10mM Tris-HCl
扩增反应试剂	HBV-RNA 内标	50μL (1管)	含内标片段的假病毒溶液
	DNA酶 I	100μL (1管)	DNA酶I, 甘油
	HBV-RNA 反应液 A	0.5mL (1管)	HBV-RNA特异性引物及探针、内标引物及探针、dNTPs、10×RT-PCR Buffer
	HBV-RNA 反应液 B	1.25mL (1管)	2×逆转录缓冲液、逆转录酶、TaqDNA聚合酶
	HBV-RNA 弱阳性质控品	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液
	HBV-RNA 强阳性质控品	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液
	阴性质控品A	1.0mL (1管)	阴性血浆/血清 (已灭活)
	阴性质控品B	1.0mL (1管)	含HBV-DNA目标片段的假病毒溶液
	HBV-RNA 阳性定量参考品 1	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁴ copies/mL)
	HBV-RNA 阳性定量参考品 2	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁵ copies/mL)
	HBV-RNA 阳性定量参考品 3	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁶ copies/mL)
	HBV-RNA 阳性定量参考品 4	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁷ copies/mL)

备注:

1) 不同批号产品间的成分不得混用或互换。

2) 自备试验试剂及器材: 异丙醇、无水乙醇、1.5 mL 的 RNase-Free 离心管、PCR 反应管、移液器枪头 (建议使用带滤芯的枪头, 规格: 10μL、200μL、1000μL); 离心机; 震荡混合器; 磁珠分离器; 各种规格的移液器。

【储存条件及有效期】

本试剂盒有效期 6 个月, 避光密闭保存, 其中 A 盒 (磁珠法核酸提取试剂) 置于室温保存; B 盒 (扩增反应试剂) 置于-20±5℃保存。

B 盒 (扩增反应试剂) 应避免反复冻融, 冻融次数不超过 5 次; 试剂开瓶后, 在室温条件下放置时间不应超过 8 小时。

本试剂盒生产日期和失效日期见产品包装标签。

【适用仪器】

实时荧光定量 PCR 仪: ABI Prism 7500, LightCycler480, 杭州博日 9600plus。

【样本要求】

1. 适用标本类型: 血清。

2. 标本采集:

静脉采血后 24 小时内分离, 然后吸取上层血清, 转移至 1.5mL 灭菌离心管备用。

3. 样本保存:

经上述处理后的待测血清样本可立即用于检测, 或-20±5℃保存 (3 个月)。可于-70℃以下长期保存 65 个月。应避免反复冻融。

【检验方法】

1. 试剂准备 (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后, 混匀备用;

1.2 在裂解液中加入 5mL 异丙醇, 充分混匀后备用。

1.3 在洗液 1 中加入 10 mL 无水乙醇, 充分混匀后备用。

1.4 在洗液 2 中加入 20 mL 无水乙醇, 充分混匀后备用。

1.5 根据待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 的数量, 按照裂解液 300μL/人份+HBV-RNA 内标 1.0μL/人份的比例, 取相应量的裂解液及 HBV-RNA 内标, 充分混匀成裂解液 mix 备用。

1.6 根据待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 的数量, 按照 48μL/人份洗脱液+2.0μL/人份的 DNA 酶 I 比例, 取相应量的洗脱液及 DNA 酶 I, 充分混匀成洗脱液 mix 备用。

1.7 根据待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 的数量, 按照 HBV-RNA 反应液 A 10μL/人份+ HBV-RNA 反应液 B 25μL/人份的比例, 取相应量的 HBV-RNA 反应液 A 及 HBV-RNA 反应液 B, 充分混匀成 PCR-mix, 按照 35μL/人份分装至 PCR 反应管中, 盖上 PCR 反应管盖, 瞬时离心后备用。

1.8 将上述准备好的试剂转移至样本处理区, 待用。

2. 样本处理 (在样本处理区进行) (阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 与待测样本同步处理)

2.1 在 1.5mL 的 RNase-Free 离心管中依次加入 20μL 磁珠溶液 (使用前颠倒混匀或使用移液器吹吸混匀磁珠)、300μL 裂解液 mix、200μL 样本, 震荡混匀各离心管, 室温下颠倒混匀 10 分钟或反复吹吸混匀 10 分钟。

2.2 将离心管置于磁力架上 1 分钟, 使管内磁珠被吸附, 用移液器移走管内液体, 取下离心管。

2.3 加入 500μL 洗液 1, 使磁珠重新悬浮, 将离心管置于磁力架上 1 分钟, 使管内磁珠被吸附, 用移液器移走管内液体, 取下离心管。

2.4 加入 500μL 洗液 2, 使磁珠重新悬浮, 将离心管置于磁力架上 1 分钟, 使管

内磁珠被吸附，用移液器移走管内液体，同时保持离心管置于磁力架上，使磁珠继续被吸附。

2.5 加入 550μL 洗液 3，尽量不要冲起磁珠，1 分钟后用移液器移走管内液体，取下离心管。

2.6 加入 50μL RNA 洗脱液 mix，使磁珠重新悬浮，37℃静置 15 分钟（样本处理前将水浴锅或金属浴温度设置成 37℃），期间轻轻晃动两次使核酸充分洗脱。

2.7 将离心管置于磁力架 1 分钟，使磁珠被吸附，将液体转移至新的 1.5mL 无核酸酶的离心管中。

2.8 取洗脱后的样本提取液 15μL，加入已经分装 35μL PCR-mix 的 PCR 反应管中，盖上管盖，瞬时离心，转移到扩增区备用，记录样本加入顺序。

2.9 如操作时，发现管壁和管盖有液体，请瞬时离心使液体甩入管底，再置于磁力架上。

3. PCR 扩增（在扩增与产物分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

3.1 将 PCR 反应管放入实时荧光定量 PCR 仪样品槽中，按对应顺序设置待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品（1~4）的数量，并设置样本名称及阳性定量参考品（1~4）的浓度。

3.2 荧光检测通道选择：

选择 FAM 通道检测 HBV-RNA，选择 HEX 或 VIC 通道检测 HBV-RNA 内标，设置 SampLe Volume 为 50；ABI 仪器参比荧光（Reference Dye）选择 none。

3.3 反应程序设定：

反应程序	反应温度	反应时间	循环数
1	50℃	15min	1
2	95℃	5min	1
3	95℃	30s	10
	62℃	45s	
4	95℃	30s	35
	62℃	45s (在此步骤结束后收集荧光信号)	

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

4. 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-RNA 的曲线（FAM 通道曲线）和内标的曲线（VIC 或 HEX 通道曲线）分别进行分析。根据分析后图像调节 Base line 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 之间、End 值可设在 5-20 之间，调整阈值线位于扩增曲线指数期且阴性质控品 A 符合质量控制要求），点击 Analyze 进行分析，在 Report 界面查看结果，记录样本检测结果数值（C）。

5. 质量控制程序

每次实验均需检测阴性质控品、HBV-RNA 强阳性质控品、HBV-RNA 弱阳性质控品、HBV-RNA 阳性定量参考品（1~4）。质控品结果满足如下要求时，方可进行检测结果判定。

5.1 HBV-RNA 阴性质控品 A 和 B：检测结果均为阴性。

5.2 HBV-RNA 阳性质控品：检测结果均为阳性，HBV-RNA 强阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^8$ copies/mL，HBV-RNA 弱阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ copies/mL。

5.3 HBV-RNA 阳性定量参考品（1~4）：检测结果均为阳性，且标准曲线的相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 。

以上要求需在实验中同时满足，否则本次实验无效，需重新测定。

【阳性判断值】

检测 249 例临床样本，利用 ROC 曲线分析确定靶标阳性判断值为 $Ct \leq 26$ 。

【检验结果的解释】

1. 阴性结果判定：FAM 通道无“S”型扩增曲线或 Ct 值 > 26 ，VIC/HEX 通道有明显“S”型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 32 。则样本未检测到 HBV-RNA，样本浓度低于试剂盒的检出限。

2. 阳性结果判定：FAM 通道为“S”型扩增曲线，并且 Ct 值 ≤ 26 ，VIC/HEX 通道扩增为“S”型曲线，且 Ct 值 ≤ 32 。

2.1 $C < 300$ copies/mL：检出浓度低于检出限，检测结果的阳性检出率 $< 95\%$ 。

2.2 $300 \leq C < 1.0 \times 10^3$ copies/mL：检出浓度位于检出限与线性范围下限之间，检测结果的阳性检出率 $\geq 95\%$ 。

2.3 $1.0 \times 10^3 \leq C \leq 1.0 \times 10^8$ copies/mL：检出浓度位于线性范围内，线性范围内相关系数 $r \geq 0.9800$ 。

2.4 $C > 1.0 \times 10^8$ copies/mL，检出浓度高于线性范围上限，如有必要，可将样本用阴性质控品 A 或 B 稀释至线性范围内再检测。

3. 若内标 Ct 值 > 32 或者无显示，则该样本的检测结果显示无效。

【检验方法的局限性】

样本检测结果与样本的收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都可能导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

1. 准确性：准确度参考品的检测结果为阳性，且浓度的对数值与理论浓度的对数值的绝对偏差不超过 ± 0.5 个对数数量级。

2. 参考品符合率：阴性参考品符合率，阳性参考品符合率均为 100%。

3. 检出限：检出限为 300 copies/mL。

4. 线性范围：线性范围为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ copies/mL，线性范围内相关系数 $|r| \geq 0.9800$ 。

5. 精密度：批内精密度 $CV \leq 5\%$ 。

6. 经过对 HBV 基因型 A~G（A、E、F、G 为假病毒模拟样本，B、C、D 为临床样本）验证，临床研究中 HBV 基因型 B、C、D 验证，本试剂盒可以检测 HBV 基因型 A~G。

7. 试剂盒与人巨细胞病毒、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、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、丙酸痤疮杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等无交叉反应。

8. 总胆红素 (≤ 28 mg/dL)，甘油三酯 (≤ 3000 mg/dL)，血红蛋白 (≤ 22 g/dL)，总 IgG (≤ 40 g/L) 对试剂盒的检测结果显示无干扰。

9. HBV DNA 浓度小于等于 2×10^7 IU/mL 时对本试剂盒检测结果不产生干扰。

10. 参考《慢性乙型肝炎防治指南》，并结合临床验证数据分析，推测在不同时期的慢性 HBV 感染者样本中，HBV RNA 的检出率为：慢性 HBV 携带者 $> HBcAg$ 阳性的慢性乙型肝炎患者 $> B$ 型肝炎肝硬化 $> HBcAg$ 阴性的慢性乙型肝炎患者 $> B$ 非活动性 HBsAg 携带者。虽然不同期患者血清 HBV RNA 水平存在差异，但临床决策还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。

11. 临床评价：在 3 家临床机构完成 1033 例样本的临床试验，与参比方法相比，阳性符合率为 99.26%、阴性符合率为 98.99%、总符合率为 99.13%；在 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$ copies/mL 范围内，本产品与参比方法相比，检测结果经线性回归方程分析，二者无显著性差异。

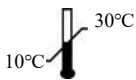
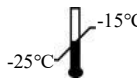
慢性 HBV 感染者 NAs 抗病毒治疗的 HBcAg 阳性患者样本 78 例，接受 NAs 治疗 48 周时血清 HBV-RNA 以 708 copies/mL 为阈值预测治疗五年时 HBcAg

转阴率，其曲线下面积（AUC）为 0.874，阳性预测值为 80.6%，阴性预测值为 83.3%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外检测，实验前请仔细阅读本说明书。
2. 实验前请熟悉和掌握需要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，实验人员需要进行专业培训，实行严格分区进行（试剂准备区、样本处理区、扩增和产物分析区），所有耗材应为灭菌后一次使用或购买 RNase-Free 的耗材，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区域用品不能交叉使用。
4. 为避免样本中的潜在生物危险，所有检测样本应视为具有传染性物质，实验过程中应穿工作服，带一次性手套并经常替换手套避免交叉污染；样本操作和废弃物处理均应符合相关法规要求：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. 所有试剂在使用前，均需要在室温下充分融化、混匀后使用，但应避免反复冻融；试剂盒各组分应在有效期内使用，且不同批次产品间不能混用。
6. 样本核酸提取后，建议立即进行下一步实验，否则请保存于-20±5℃待用（24h 内），长期保存应置于-70℃以下环境中保存。
7. 实验结束后用 10%次氯酸或 75%酒精处理工作台和移液器，然后用紫外线灯照射 20~30 分钟。

【标识的解释】

	查阅使用说明		体外诊断医疗器械
	A 盒温度极限 (10℃~30℃)		B 盒温度极限 (-15℃~-25℃)
	不得二次使用		

【参考文献】

1. Jie Wang, Tao Shen, Xiangbo Huang, et al., Serum Hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound [J]. Journal of Hepatology, 2016.
2. 鲁凤民, 王杰, 庄辉. HBV RNA 病毒样颗粒的潜在临床意义 [J]. 中华肝脏病杂志, 临床肝胆病杂志, 《肝脏》杂志. 2016, 32 (9): 1635-1636.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：北京热景生物技术股份有限公司

住所：北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街 9 号 9 幢

联系方式：

售后服务单位名称：北京热景生物技术股份有限公司

联系方式：

生产地址：北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街 9 号 9 幢

生产许可证编号：

【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】