

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】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】 48 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒主要用于定量检测人血清/血浆样本中的乙型肝炎病毒核酸(HBV DNA)。

主要通过检测乙型肝炎患者血中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。本试剂盒的检测结果不得单独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。本试剂盒不用作血源筛查。

【检验原理】

乙型肝炎病毒可导致乙型肝炎,是急性和慢性肝炎、肝硬化和肝细胞癌的主要流行病学因子之一,其最直接、最可靠的病毒复制检测方法是血清或血浆 HBV DNA 定量检测。研究显示:经过α-干扰素、拉米夫定、甘昔洛韦等药物的治疗,患者的 HBV DNA 滴度会迅速、持续性下降。因此,HBV DNA 定量检测是一种有价值的工具,可与其它血清学标志物联用。

本试剂盒采用PCR-荧光探针法(Taqman法)对HBV DNA进行体外扩增和定量检测。本试剂盒选择HBV基因组高度保守的特异基因作为靶序列进行体外扩增。

本试剂盒使用非竞争性假病毒内标,可以全程监测包括核酸提取和扩增检测的整个检测过程,避免假阴性发生。HBV检测探针与内标探针均带有荧光报告基团和淬灭基团,通过标记不同波长的荧光基团来区分,在不同的波长区独立检测。

本试剂盒采用工作标准品法定量。扩增曲线指数增长时的PCR循环数(Ct)与起始模板浓度(C)的对数(LogC)呈线性关系,通过对已知浓度的系列工作标准品的检测,仪器自动拟合出关于Ct与LogC的标准曲线及方程,待测样本根据检测Ct值,由软件自动获得其起始浓度。

本试剂盒扩增体系采用 UNG-dUTP 防污染措施,PCR 扩增前 50℃保温 2 分钟,利用 UNG 将反应管中可能存在的扩增产物污染充分降解,以排除由此引起的假阳性检测结果。

【主要组成成分】

1. 试剂盒成分

本试剂盒包括扩增检测试剂及对照试剂:

类 别	试剂名称	规 格	主要组份
扩增检测试剂	[HBV PCR反应液]	960μL/管×1管	含引物、荧光探针、Taq酶、Buffer、dNTP
质控品	[HBV内标]	48μL/管×1管	含人工制备的内标DNA假病毒
	[HBV强阳性对照]	400μL/管×1管	含已灭活的HBV病毒血浆
	[HBV临界阳性对照]	400μL/管×1管	含已灭活的HBV病毒血浆
	[HBV阴性对照]	400μL/管×1管	含已灭活的HBV DNA检测为阴性的血浆
定量标准品	[HBV工作标准品①]	400μL/管×1管	含人工制备的HBV DNA假病毒, 1.0×10 ⁸ IU/mL ~5.0×10 ⁸ IU/mL
	[HBV工作标准品②]	400μL/管×1管	含人工制备的HBV DNA假病毒, 1.0×10 ⁶ IU/mL ~5.0×10 ⁶ IU/mL
	[HBV工作标准品③]	400μL/管×1管	含人工制备的HBV DNA假病毒, 1.0×10 ⁴ IU/mL ~5.0×10 ⁴ IU/mL
	[HBV工作标准品④]	400μL/管×1管	含人工制备的HBV DNA假病毒, 1.0×10 ² IU/mL ~5.0×10 ² IU/mL

- 备注:
- 试剂盒内的生物样本均已灭活处理,但并不排除含有潜在的传染性物质,应严格按照《医疗机构临床基因扩增管理办法》(卫办医政发〔2010〕194号)、《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院第424令),在符合要求的实验室内操作;
 - 不同批号产品的成分之间不得混用或互换。
 - 必要但本试剂盒不包括的试剂、器材:
 - 移液器;
 - 与移液器配套的无RNA酶和DNA酶带滤芯吸头;
 - 0.2mL薄壁PCR反应管、8联管或反应板;
 - 台式振荡器;
 - 台式离心机;
 - 核酸提取试剂(山东见微生物科技有限公司制造的货号为EMMR001A的核酸提取试剂);
 - 核酸纯化仪。

【储存条件及有效期】

保存温度:试剂盒应密闭于-18℃以下保存。

未开封有效期:有效期为12个月,避免反复冻融。

开封稳定性:-18℃以下保存,有效期截止时间与未开封试剂有效期截止时间相同;在2~8℃条件下可稳定保存5天。

冻融稳定性:最大允许反复冻融(-18℃以下/室温复融)的次数为3次。

生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

核酸扩增仪:ABI 7500/7300、Roche LightCycler480、SLAN实时荧光定量PCR仪。

【样本要求】

- 样本采集:采用血清或血浆样本进行检测,均按国家卫计委临床检测相关要求进行样本采集。
 - 血清样本:受检者静脉血注入血清分离管中,室温或2~8℃静置2小时后,待测样本自行析出血清,或直接室温或低温2000-4000×g离心5分钟获取上清,转移上清(注意勿吸入红细胞)至无菌样本管中,即为血清样本;
 - 血浆样本:受检者静脉血注入血浆分离管中(抗凝剂可为枸橼酸盐类或EDTA盐类,不可使用肝素类抗凝剂。推荐带有惰性分离胶的血浆分离管),室温或2~8℃静置2小时后,室温或低温2000-4000×g离心10分钟获取血浆,转移上清(注意勿吸入红细胞)至无菌样本管中,即为血浆样本。
- 样本存放:采集的未分离全血样本必须保存于2-25℃,并在采集后24小时内完成离心以获取血清或血浆。血清或血浆样本如在24小时内检测可保存于2~8℃。如血清或血浆样本无法及时检测,应保存于-18℃以下,检测前取出恢复至室温,最长可保存1个月。如血清或血浆样本需长期保存,请保存在-80℃以下。全血样本不能进行冻融,血清和血浆样本也应避免反复冻融,最大允许反复冻融次数为5次。
- 样本运输:采集样本运输应遵循《可感染人类的高致病性病原微生物菌(毒)种或样本运输管理规定》(卫生部第54号令)、《病原微生物实验室生物安全管理条例》(国务院第44号令)等相关规范进行管理。未经分离的全血样本必须于2-25℃保存温度下进行运输,且在采集后24小时内完成离心。血清或血浆样本可在2-8℃或-18℃以下的运输保存温度下进行运输。

【检验方法】

- PCR试剂准备(在试剂准备区进行)
 - 取出试剂盒中[HBV PCR反应液],在室温完全融化成液态后,振荡混匀,低速离心数秒;
 - 每次试验的扩增反应数=待测样本数+7,按此数量准备PCR反应管,在每个PCR反应管中加入20μL [HBV PCR反应液],然后将装有[HBV PCR反应液]的反应管转移至样本处理区。
- 核酸提取(在样本处理区进行)

取出试剂盒中[HBV内标]、[HBV阴性对照]、[HBV强阳性对照]、[HBV临界阳性对照]、[HBV工作标准品①]、[HBV工作标准品②]、[HBV工作标准品③]和[HBV工作标准品④],在室温完全融化成液态后,振荡混匀,低速离心数秒;取出200μL进行核酸提取(详细步骤请参照对应的核酸提取试剂盒使用说明书),其提取所得模板可用于下一步扩增。
- PCR扩增体系构建(在样本处理区进行)

按照试验设定的PCR反应管布局,在每个装有HBV PCR反应液的反应管中分别加入各自对应的30μL核酸提取模板,盖上班盖或贴上封膜,振荡混匀,低速离心数秒,转移到扩增检测区。
- PCR扩增检测(在扩增检测区进行)
 - 将反应管按照试验设定的PCR反应管布局放入荧光PCR扩增仪进行扩增检测。
 - 循环参数设定:(请参照仪器的操作软件进行设置)

步骤	温度(℃)	时间(秒)	循环数
1	UNG酶反应	50	120
2	预变性	95	120
3	变性	95	5
	退火、延伸及检测荧光	60	30
步骤3中60℃时荧光检测，检测通道：HBV DNA(FAM)、内标 (HEX或VIC)，可选择ROX为参比荧光。			

4.3 样本设置：在所用的荧光定量PCR仪软件的相应样本设置窗口内填写各样本的名称、类型及工作标准品参数(详见荧光定量PCR仪说明书，注意试剂盒内工作标准品标签标示量其参数每批可能不同，不同批次请勿混用)。

5. 质控标准

- 5.1 工作标准品的相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。
- 5.2 阴性对照：FAM检测Ct值应为无数值或为45，且内标Ct值 ≤ 40 ；
- 5.3 临界阳性对照：检测浓度值介于50IU/mL~5×10²IU/mL；
- 5.4 强阳性对照：检测浓度值介于5.0×10⁵IU/mL~5.0×10⁶IU/mL；
- 5.5 应同时满足上述所有条件，否则试验无效。

6. 检测结果

根据各类仪器的软件进行定量分析，基线建议选取3~15，或根据不同的仪器、样本检测的具体情况设置基线，阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方；还可由荧光定量PCR仪自动选择，优先考虑仪器自动选择。

【阳性判断值】

FAM检测Ct值有数值且Ct值 ≤ 41 为阳性；Ct值范围41~45之间定义为灰区，建议可通过复测以降低误诊和漏诊的可能性；FAM检测Ct值无数值或为45,且VIC/HEX检测Ct ≤ 40 为阴性或低于检测限。

【检验结果的解释】

检测结果	内标	结果判定
无数值	无数值	检测可能受到抑制，需要复测或稀释后复测。
无数值	有数值且Ct值 ≤ 40	未检出HBV DNA或标本中HBV DNA含量低于检测极限值。
<20IU/mL	有数值且Ct值 ≤ 40	低于试剂盒定量检测线性范围下限，所测定量结果仅供参考，报告上注明<20IU/mL，检出HBV DNA。
20~1.0×10 ⁹ IU/mL	有数值且Ct值 ≤ 40	直接报告相应的病毒载量。
>1.0×10 ⁹ IU/mL	有数值且Ct值 ≤ 40	高于试剂盒定量检测线性范围上限，所测定量结果仅供参考，报告上注明>1.0×10 ⁹ IU/mL。若需准确定量，可根据检测结果，将该样本用HBV DNA阴性血清或血浆稀释至线性范围后复测。

【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、其它实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。
2. 可靠的结果取决于样本采集、转运、储存及处理程序。
3. 该试剂仅限于规定的样本类型及适用机型。
4. 该试剂的引物、探针覆盖的病毒基因组高度保守片段内部发生的突变可能会导致检测到的病毒含量偏低或者检测不到病毒。
5. HBV DNA的定量结果取决于样本中存在的病毒颗粒数，而这会受到样本收集方法，病人因素（如年龄，是否存在症状）和/或感染阶段等因素的影响。

【产品性能指标】

1. 外观：外包装印刷准确，完好无损。试剂盒内液体组份齐全，密封良好，无漏液现象，无沉淀及异物。标签及说明书齐全，准确。
2. 定量检测线性范围：20IU/mL~1.0×10⁹IU/mL；
3. 阴性参考品符合率：检测国家HBV DNA阴性参考品，或检测经国家HBV DNA参考品或者WHO HBV DNA参考品标定的企业阴性参考品，检测结果全部为阴性，且内标Ct值 ≤ 40 。
4. 阳性参考品符合率：检测国家HBV DNA阳性参考品，或检测经国家HBV DNA参考品或者WHO HBV DNA参考品标定的企业阳性参考品，检测结果全部为阳性。
5. 准确度：检测国家HBV DNA定量参考品，或检测经国家HBV DNA参考品或者WHO HBV DNA参考品标定的企业定量参考品，定量结果与标准值的绝对偏差范围在0.5个对数数量级内。
6. 精密度：检测高、低两个不同浓度的国家HBV DNA定量参考品，或检测经国家HBV DNA参考品或者WHO HBV DNA参考品标定的企业精密度参考品，各检测10次，定量结果对数值的变异系数（CV）不大于5%。
7. 最低检测限：10IU/mL。
8. 其它研究：
 - 8.1 特异性：检测人巨细胞病毒、EB病毒、人类免疫缺陷病毒1型、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、梅毒螺旋体、人类疱疹病毒6型、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒II型、甲型流感病毒、痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌均无特异性扩增；
 - 8.2 亚型检测能力：检测HBV的A-H 7个亚型，结果均为阳性，且定量值与标准值的绝对偏差范围在0.5个对数数量级内；
 - 8.3 干扰物质：样本中血红蛋白低于50mg/dL，甘油三酯水平低于47.6 mmol/L，胆红素水平低于1700 μmol/L，EDTA水平低于75 mg/mL，白蛋白低于30g/L和IgG低于60mg/mL对本试剂HBV DNA的定量检测没有干扰。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外诊断试剂，仅供体外诊断。
2. 肝素抑制PCR反应，以血浆作为待测样本时避免使用肝素类抗凝管。
3. 实验时应穿工作服，戴一次性无尘手套(经常替换手套)，使用一次性用品。
4. 试剂盒各组分使用前请在室温下充分融化并振荡混匀，并低速离心数秒后使用。
5. 样本采集及储存过程避免样本间交叉污染，在样本处理阶段建议使用生物安全柜。
6. 操作过程中用到的生物安全柜、移液器、离心机、扩增仪等仪器设备推荐在试验前后均用75%乙醇进行消毒，操作过程中用到的工作台面在试验前后推荐使用0.1~1%的次氯酸溶液消毒，并用紫外灯近距离照射0.5小时以上。
7. 废弃吸头应弃于含有10%次氯酸钠的废液缸中，以防止污染。
8. 试剂盒内阴性对照或其它可能含有人源物质的组分，虽已经通过了HBsAg、HIV1/2抗体、HCV抗体项目的检测，使用PCR技术未检测到HBV DNA、HCV RNA、HIV-I RNA，但截至目前，没有任何一项检测可以确保绝对安全，故仍应将这些组份作为潜在传染源对待。
9. 实验室管理应严格按照国家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。
10. 对于检测结果为阴性的样本，应确定乙型肝炎病毒内标的扩增信号是否正常，以避免假阴性结果；对于检测结果为阳性的样本，乙型肝炎病毒内标的扩增信号可不予考虑。

【参考文献】

- [1]. Lai C L, Ching C K, Tung S K, et al. Lamivudine is effective in suppressing Hepatitis B Virus DNA in Chinese Hepatitis B surface antigen carriers: A placebo-controlled trial. Hepatology. 1997. 25:241-244.
- [2]. Nagata I, Colucci G, Gregorio G V, et al. The role of HBV DNA quantitative PCR in monitoring the response to interferon treatment in chronic hepatitis B virus infection. Journal of Hepatology. 1999. 30:965-969.
- [3]. Hadziyannis S J, Manesis E K, and Papakonstantinou A. Oral ganciclovir treatment in chronic hepatitis B virus infection: a pilot study. Journal of Hepatology. 1999. 31:210-214. 05382874001-05EN 42 Doc Rev. 5. 0.
- [4]. Marcellin P, Chang T T, Lim S G, et al. Adefovir Dipivoxil for the treatment of Hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitive chronic hepatitis B. New England Journal of Medicine. 2003.348: 808-816.

【基本信息】

生产企业名称：山东见微生物科技有限公司
住所：山东省济南市高新区大正路1777号生物医药园中小企业产业化基地5号楼101厂房和6号楼105厂房
联系方式：0531-82315138
售后服务单位名称：山东见微生物科技有限公司
联系方式：0531-82315138
生产地址：山东省济南市高新区大正路1777号生物医药园中小企业产业化基地6号楼105厂房
生产许可证编号：鲁食药监械生产许20190015号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准20193400213

【说明书核准日期及修改日期】 2019 年 06 月 05 日