

【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】

大包装，48 人份/盒；
单管单人份，48 人份/盒；
单管单人份，24 人份/盒。

【预期用途】

本试剂盒适用于定量检测人血清或血浆样品中乙型肝炎病毒 DNA 的含量。

乙型肝炎病毒（HBV）为嗜肝 DNA 病毒，主要通过血液传播，目前在我国的感染率约为 8%，临床上约有 10~20% 的急性乙型肝炎患者可转为慢性，受 HBV 慢性感染的人群罹患原发性肝癌的相对危险性至少比正常人群高 100 倍。HBV 基因型共有 8 种，其中 B、C 和 D 型为亚洲常见。HBV 基因组含有 4 个开放读码框架（ORF）分别称为 S、C、P 和 X 区，各区域均存在不同程度的变异。

检测结果仅供临床参考，不能单独作为确诊或排除病例的依据。

【检验原理】

本试剂盒利用荧光 PCR 技术，以 HBV 基因组中相对保守区为靶区域，设计特异性引物及荧光探针，在样本核酸纯化之后，通过 PCR 对 HBV DNA 进行快速定量检测。另外，本试剂盒还带有内标物质，用于对核酸提取的整个过程进行监控，减少假阴性结果的出现。

使用本试剂盒推荐的核酸提取试剂对临床样本进行处理和核酸提取，以试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制 PCR 反应管，将提取的核酸加入 PCR 反应管中，使用荧光定量 PCR 仪进行 PCR 扩增，并检测荧光信号，仪器软件系统自动绘制出实时扩增曲线，根据阈值循环值（Ct 值）实现对未知样本的定量检测。

【主要组成成分】

试剂盒中包含的试剂组分

	组分名称	规格	数量	主要成分
质控品及阳性定量参考品 (适用于大包装规格、单管 单人份规格)	阴性质控品	600μL/管	1	阴性血浆
	HBV 强阳性质控品	600μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒
	HBV 临界阳性质控品	600μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒
	HBV 阳性定量参考品 1 (5.0×10^6 IU/mL)	600μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒
	HBV 阳性定量参考品 2 (5.0×10^5 IU/mL)	600μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒
	HBV 阳性定量参考品 3 (5.0×10^4 IU/mL)	600μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒
	HBV 阳性定量参考品 4 (5.0×10^3 IU/mL)	600μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒
PCR 检测试剂 (适用于大包装规格)	HBV 内标溶液	250μL/管	1	内标质粒及稳定剂
	HBV 反应液 A	96μL/管	1	HBV 特异性的引物和探针
	HBV 反应液 B	144μL/管	1	热启动 Taq 酶、UNG 酶
	HBV 反应液 C	720μL/管	1	MgCl ₂ 、Brij-58、Tris 盐酸 Buffer
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份 48 人 份/盒规格)	HBV 内标溶液	250μL/管	1	内标质粒及稳定剂
	HBV-PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	48	HBV 特异性的引物和探针、热启动 Taq 酶、UNG 酶
PCR 检测试剂 (适用于单管单人份 24 人 份/盒规格)	HBV 内标溶液	125μL/管	1	内标质粒及稳定剂
	HBV-PCR 反应管(未贴标签管)	1 人份/管	24	HBV 特异性的引物和探针、热启动 Taq 酶、UNG 酶

不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

需自备的试剂：本公司生产的核酸提取或纯化试剂。

【储存条件及有效期】

试剂盒有效期 9 个月。PCR 检测试剂、质控品、阳性定量参考品组分保存于 -20±5℃。

保存期间，请避免反复冻融（反复冻融次数应在 4 次以内）；开封后，试剂常温存放能稳定 8 小时；PCR 试剂在运输过程中应使用干冰或冰袋进行保存，运输时间不长于 4 天；

本试剂盒的生产日期及使用期限，详见本试剂盒的包装标签。

【适用仪器】

ABI Prism 7300, ABI Prism 7500, LightCycler480, Abbott m2000 system, AGS 4800。

【样本要求】

1 适用标本类型：血清或血浆。

2 标本采集：

- 2.1 血清 — 用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 毫升，注入无菌的干燥玻璃管，室温（22~25℃）放置 30~60 分钟，血标本可自发完全凝集析出血清，或直接使用水平离心机，1500 rpm 离心 5 分钟；吸取上层血清，转移至 1.5mL 灭菌离心管。
- 2.2 血浆 — 用一次性无菌注射器抽取受检者静脉血 2 毫升，注入含 EDTA-2Na（乙二胺四乙酸二钠）或枸橼酸钠抗凝剂的玻璃管，立即轻轻颠倒玻璃管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血充分混匀，5~10 分钟后即可分离出血浆，转移至 1.5mL 灭菌离心管。
- 3 标本保存和运送：所采集的标本可立即用于测试，也可以保存于-20±5℃待测，保存期为 6 个月。标本运送采用 0℃冰壶。

【检验方法】

1 样本处理和核酸提取（样本制备区）

样本处理和核酸提取可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（推荐产品备案号：粤穗械备 20150301 号、粤穗械备 20150302 号或粤穗械备 20150348 号），本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，若提取试剂盒中无说明内标的使用方法，则可按照样本体积：内标溶液体积=50:1 的比例在样本中加入内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的质控品及阳性定量参考品均需要提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。

2 PCR 试剂准备（试剂准备区）

大包装：

2.1 ABI Prism 7300, ABI Prism 7500, LightCycler480, AGS 4800:

从试剂盒中取出 HBV 反应液 A、HBV 反应液 B、HBV 反应液 C，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

取 N 个（N=待测样本个数+阴性质控品+HBV 强阳性质控品+HBV 临界阳性质控品+4 管 HBV 阳性定量参考品）PCR 反应管，HBV 单人份扩增体系配制如下表：

组分	HBV 反应液 A	HBV 反应液 B	HBV 反应液 C	总体积
用量	2μL	3μL	15μL	20μL

将各组分充分混合，混合好后进行短时离心将管壁上的液体全部离心至管底，之后将 20μL 扩增体系分装到 PCR 管中。

2.2 Abbott m2000 system:

从试剂盒中取出 HBV 反应液 A、HBV 反应液 B、HBV 反应液 C，室温融化后振荡混匀，8,000rpm 离心数秒后使用。

按比例取 PCR 试剂组分到 4mL MasterMix 管中混合，充分混匀后打开螺口管盖，放置在 Abbott m2000 sp 中，同时将 PCR 扩增板放入 Abbott m2000 sp 中，选择相应的程序，运行。程序运行完毕后，盖好热盖膜，3,000rpm 离心数秒，备用。

单管单人份：直接使用 HBV-PCR 反应管。

3 加样（样本制备区）

往上述 HBV 反应管中用带滤芯吸嘴分别加入提取后的待测样本核酸、HBV 阴性质控品、HBV 强阳性质控品、HBV 临界阳性质控品和 HBV 阳性定量参考品 40μL。盖紧管盖，8,000rpm 离心数秒后转移至扩增检测区。

4 PCR 扩增（扩增和产物分析区）

4.1 ABI Prism 7300, 7500 仪器设置

4.1.1 打开“Setup”窗口，按样本对应顺序设置阴性质控（NTC）、阳性质控以及未知样本（Unknow）、阳性定量参考品（Standard），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称；探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: TAMRA, Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: none, Passive Reference: NONE。

4.1.2 打开instrument窗口，设置循环条件如下：

50℃ 2分钟，1个循环；95℃ 15分钟，1个循环；94℃ 15秒→55℃ 45秒（收集荧光），45个循环。

设置完成后，保存文件，运行程序。

4.2 LightCycler480仪器设置

4.2.1 打开软件后，选择“New Experiment”，设置检测模式为“Multi Color Hydrolysis Probe/UPL Probe”，检测通道为FAM和VIC,反应体积为60μL。

4.2.2 设置循环条件：

Program name	Cycles	Targer(℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 02: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	45	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

4.2.3 选择“Sample Editor”，设定样品的名称、类型，在“Standard Concentration”框中输入标准品浓度，设置完成后，保存文件，运行程序。

4.3 Abbott m2000 rt仪器设置

4.3.1 将带有 protocol 的 CD 光盘载入 system 计算机，安装扩增程序，在 Abbott m2000 rt 中选择相应的扩增指令，将加完核酸的 PCR 反应管放入仪器样品槽，关闭仪器舱门，运行扩增程序。

4.4 AGS 4800 仪器设置

4.4.1 先开电脑，再开定量 PCR 仪主机电源，最后启动 AGS4800 软件，选择对应的层（上、中、下）。

4.4.2 点击“新建”，在试验名称中编辑实验名、文件路径，保存后点击确定打开一个空白文件。

4.4.3 点击对应层次后的“锁头”，打开扩增仪器，将反应管放入仪器样品槽内。再点击“锁头”，关闭扩增仪器。

4.4.4 打开“程序参数”窗口，扩增参数如下：

Program Name	Cycles	Temperature Target (℃)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 02: 00	None	None
2	1	95	00: 15: 00	None	None
3	45	94	00: 00: 15	None	None
		55	00: 00: 45	Quantification	Single
4	1	40	00: 00: 20	None	None

- “加液量”设定为 60 μL。
- 4.4.5 打开“样本参数”窗口，在菜单快捷键中选择当前程序染料设置（通道 1 FAM，通道 2 VIC）在 48 孔表中选定样品孔，右边染料类型勾选 FAM 和 VIC，并选择对应的样本类型：标准，未知，阴性等。
- 4.4.6 启动扩增：确认仪器参数，点击开始运行按钮启动 PCR 扩增。
- 4.4.7 监控进程：切换程序运行页面，可以实时显示 PCR 曲线随着循环增加而逐步增长的实际情况。如果标记物选 FAM 或 VIC，只显示对应探针的变化情况。
- 4.4.8 保存结果：程序结束后，自动保存到文件路径。

5 结果分析

反应结束后自动保存结果，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 值可以在 3~15、End 值可设在 5~20，在 Log 图谱窗口设置 Threshold 的 Value 值，使基线位于扩增曲线指数期，调整阴性质控品的扩增曲线平直或低于阈值线），点击 Analysis 自动获得分析结果，在 Report 界面察看结果，记录未知样本数值(C)。

6 质量控制

- 阴性质控品：FAM 检测通路扩增曲线无对数增长长期或 Ct 值等于 45，VIC 检测通路扩增曲线为明显对数增长长期；
- HBV 阳性质控品：FAM 检测通路扩增曲线有明显对数增长长期且 Ct 值小于 40，HBV 强阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^6 \sim 4.0 \times 10^7$ IU/mL，HBV 临界阳性质控品定值范围在 $3.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^4$ IU/mL；
- HBV 阳性定量参考品：FAM 检测通路扩增曲线有明显对数增长长期，且 Ct 值<40，且 $R^2 \geq 0.97$ ；
- 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。

7 结果判断

- 7.1 如果在 FAM 检测通道扩增曲线无明显对数增长长期或 Ct 值等于 45，且在 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长长期，则判样品的 HBV DNA 浓度小于检测灵敏度。
- 7.2 如果在 FAM 检测通道扩增曲线有对数增长长期且 Ct 值小于 45，则按以下方法判断：
- 若样品的 $20 \leq C \leq 1.00E+009$ ，则该样品的 HBV DNA 浓度= C IU/mL；
- 若样品的 $C > 1.00E+009$ ，则该样品的 HBV DNA 浓度 $> 1 \times 10^9$ IU/mL；如果需要精确定量结果，可将样品稀释到线性范围后再检测，则该样品的 HBV DNA 浓度= (C × 稀释倍数) IU/mL；
- 若样品的 $10IU/mL \leq C < 20IU/mL$ ，同时 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长长期，则该样品的 HBV DNA 浓度仅作参考；
- 若样品的 $C < 10IU/mL$ ，同时 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长长期，则该样品的 HBV DNA 浓度低于试剂盒的检测下限。

【阳性判断值】

根据临床样本的检测结果，确定本试剂盒的参考值为 Ct 值等于 45。

【检验结果的解释】

1. 每次实验均需检测阴性质控品，HBV 强阳性质控品，HBV 临界阳性质控品，质控品结果满足质量控制要求时方可进行检测结果的判定。
2. 阳性结果判定标准：在 FAM 检测通道扩增曲线有对数增长长期且 Ct 值小于 45。
3. 阴性结果判定标准：在 FAM 检测通道扩增曲线无明显对数增长长期或 Ct 值等于 45，在 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长长期。
4. 报告建议采用以下格式：
- 阴性结果报告格式为：样本未检测到乙型肝炎病毒 DNA，浓度低于试剂盒的灵敏度；
- 阳性结果报告格式为：
- 1) 当样本试验结果 HBV DNA 浓度在 $20IU/mL \leq C \leq 1.00E+009IU/mL$ 时，报告格式为：样本检测到乙型肝炎病毒 DNA，其浓度为 C IU/mL；
- 2) 当样本的试验结果 HBV DNA 浓度 $C > 1.00E+009IU/mL$ 时，报告格式为：样本检测检测到乙型肝炎病毒 DNA，其浓度大于 1×10^9 IU/mL，如经稀释后检测，则报告格式为：样本检测到乙型肝炎病毒 DNA，浓度为 (C × 稀释倍数) IU/mL；
- 3) 当样本的试验结果 HBV DNA 浓度 $10IU/mL \leq C < 20IU/mL$ ，同时 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长长期，报告格式为：样本的乙型肝炎病毒 DNA 载量较低，测量值仅供参考；
- 4) 当样本的试验结果 HBV DNA 浓度 $C < 10IU/mL$ ，同时 VIC 检测通道扩增曲线有对数增长长期，报告格式为：样本的乙型肝炎病毒 DNA 含量低于试剂盒的检测下限；若内标检测通道扩增曲线无对数增长长期或无 Ct 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检测（若结果仍为无效，请与本公司联系）。
5. 本检测结果仅供临床参考，如需确诊病例请结合临床症状及其他检测手段。

【检验方法的局限性】

样本检测结果和样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致假阴性结果。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。

【产品性能指标】

1. 根据产品性能评估结果，本试剂盒的线性范围为 20IU /mL~ 1.0×10^9 IU/mL，对乙型肝炎病毒 B 型、C 型、D 型、B/C 型混合、C/D 型混合样本的检测灵敏度均为 10IU/mL。
2. 分析特异性：
 - a) 本试剂盒与感染部位相同或感染症状相似的病毒或其他病毒（人巨细胞病毒，EB 病毒 (EBV)，人类免疫缺陷病毒 1 型 (HIV-1)，丙型肝炎病毒 (HCV)，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，痤疮丙酸杆菌，金黄色葡萄球菌，白色念珠菌）无交叉反应；
 - b) 浓度不大于 30mg/dL 的胆红素，不大于 3200mg/dL 的甘油三酯，不大于 28g/dL 的血红蛋白，不大于 6g/dL 的白蛋白对试剂盒的检测无干扰。
3. 试剂盒的批内和批间测定精密度均可达到 CV%<5%。

【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. 为了避免样本中任何潜在的生物危险，检测样本应视为具有传染性物质，避免接触到皮肤和粘膜；样本的处理应在可防止气雾外流的生物安全柜中操作，样本制备区所用过的试管、吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃；样本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》；
3. 试剂盒中组分需在有效期内使用，不使用本试剂盒提供的组分进行实验将可能导致错误结果。
4. 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（试剂准备区、样本制备区、扩增和产物分析区），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。
5. 使用经高压灭菌的一次性离心管和吸头或购买无 DNA 酶、RNA 酶的离心管和吸头。
6. PCR 检测试剂使用前要完全解冻，8,000rpm 离心数秒后使用，但应避免反复冻融。
7. 完成样本核酸提取后，建议马上进行下一步实验，否则请保存于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 待用 (24 小时内)。
8. 如果在标本处理中没有控制好交叉污染，可能出现假阳性。
9. 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。
10. 对每次实验进行质量控制。
11. 实验完毕用 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。
12. 本试剂盒内的阳性质控品和检测样本均应视为具有传染性物质，因此标本操作和处理均需符合相关法规要求：卫生部《病原微生物实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

【参考文献】

1. Tania M. Welzel, et al. 2006. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of Hepatitis B Virus Genotypes A to G. J Clin Microbiol, 44(9):3325-33.
2. Vincent Thibault, et al. 2007. Characterization of a new sensitive PCR assay for quantification of viral DNA isolated from patients with hepatitis B virus infections. J Clin Microbiol. 45(12):3948-53.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：广州达安基因股份有限公司

住所：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：<http://www.daangene.com>

售后服务单位名称：广州达安基因股份有限公司

联系方式：

传真：020-32068820 电话：400 000 0340 020-32290789

邮政编码：510665 网址：<http://www.daangene.com>

生产地址：广州市高新技术产业开发区香山路 19 号；广州市黄埔区香山路 17 号 B104 号房

生产许可证编号：粤食药监械生产许 20040999 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】