

【产品名称】

乙型肝炎病毒(HBV)核酸测定试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】

48 测试/盒、96 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量检测人血清或血浆中的乙型肝炎病毒 DNA 核酸。

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus)是指引起人类急、慢性乙型肝炎的 DNA 病毒, 也称丹氏颗粒, 传统以检测血清感染标志物来判定 HBV 感染, 无法对患者 HBV 感染复制程度作出判断。乙型肝炎病毒核酸 DNA 定量检测主要通过监测乙肝病毒复制水平, 用于评估抗病毒治疗的应答和治疗效果。

本试剂盒不得用于 HBV 的血源筛查。同时, 本试剂盒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检测方法对病情进行综合分析。

【检验原理】

本试剂盒选用乙型肝炎病毒保守基因片段设计特异引物及特异 TaqMan 探针, 该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合。在 PCR 延伸反应过程中, Taq 酶的外切酶活性将 5'端荧光基团从探针上切割下来, 使之游离于反应体系中, 从而脱离了 3'端荧光淬灭基团的屏蔽, 即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光, 实现在全封闭反应体系中对乙型肝炎病毒核酸的自动化检测。

本试剂盒设计一段人工合成的非竞争性的序列为内标模板, 与乙型肝炎病毒的目的基因无干扰, 根据该内标模板设计引物探针, 探针选用 VIC 通道荧光标记, 从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控, 可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组成名称	主要成分	规格	
		48 测试/盒	96 测试/盒
HBV PCR 预混液	Tris-HCl、MgCl ₂ 、引物、探针、DNA 聚合酶、UNG 酶、dATP、dGTP、dCTP、dUTP、dTTP	1mL × 1	1mL × 2
HBV 临界阳性质控品	灭活人源阳性血清, 浓度为: 100IU/mL~500IU/mL	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 强阳性质控品	灭活人源阳性血清, 浓度范围: >1.0 × 10 ⁵ IU/mL	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 阴性质控品	灭活的人阴性血清	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 内标质控品	质粒	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 定量标准品 1	含 HBV 片段假病毒, 浓度范围: 1.0 × 10 ³ IU/mL~5.0 × 10 ³ IU/mL	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 定量标准品 2	含 HBV 片段假病毒, 浓度范围: 1.0 × 10 ⁴ IU/mL~5.0 × 10 ⁴ IU/mL	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 定量标准品 3	含 HBV 片段假病毒, 浓度范围: 1.0 × 10 ⁵ IU/mL~5.0 × 10 ⁵ IU/mL	1.6mL × 1	1.6mL × 1
HBV 定量标准品 4	含 HBV 片段假病毒, 浓度范围: 1.0 × 10 ⁶ IU/mL~5.0 × 10 ⁶ IU/mL	1.6mL × 1	1.6mL × 1

注: 1. 定量标准品具体标值参见试剂盒内指示, 不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

2. 本试剂盒配套使用核酸提取试剂盒为西安天隆科技有限公司生产的核酸提取或纯化试剂(陕西械备 20140007 号), 使用配套核酸提取仪为西安天隆科技有限公司生产的全自动核酸提取仪(陕西械备 20150054 号)。

【储存条件及有效期】

-20℃ ± 5℃ 保存, 有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性, 但试剂反复冻融不得超过三次; 试剂开瓶后, 在室温条件下放置时间累计不超过 8 小时; 本产品在 -25℃~8℃ 进行运输, 运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

ABI7500 实时荧光定量 PCR 仪和西安天隆科技有限公司的 Gentier96E、Gentier96R 全自动医用 PCR 分析系统。

【样本要求】

1. 标本: 血清、血浆。

2. 采集:

血清样本采集: 用一次性的无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL, 注入无菌收集管, 待自然凝固, 或 2000~4000rpm 离心 20 分钟, 吸取分离出的血清, 转移至 1.5mL 灭菌离心管中备用。

血浆样本采集: 用一次性的无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL, 注入含 EDTA 抗凝剂的无菌抗凝管中, 2000~4000rpm 离心 20 分钟, 吸取分离出的血浆, 转移至 1.5mL 灭菌离心管中备用。

3. 样本保存和运送: 经上述处理后的待测血清或血浆, 可立即用于检测, 或 2~8℃ 保存不超过 24 小时, -20℃ ± 5℃ 保存不超过 3 个月, -70℃ 以下保存不超过 2 年。应避免反复冻融。样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

建议使用西安天隆科技有限公司的全自动核酸提取仪(陕西械备 20150054 号)及其配套试剂盒核酸提取或纯化试剂(陕西械备 20140007 号)进行提取, 每份样本提取有两个裂解孔, 每个裂解孔中分别添加 200μL 样本和 5μL HBV 内标质控品进行提取, 试剂盒中 HBV 临界阳性质控品、HBV 强阳性质控品、HBV 阴性质控品和 HBV 定量标准品(1~4)按照样本处理, 提取过程请严格按照其说明书进行。

2. 试剂配制【试剂准备区】

从检测试剂盒中取出 HBV PCR 预混液, 在室温下融化并振荡混匀后, 2000rpm 离心 10sec。计算所需反应试剂份数 n[n=样本数+HBV 质控品数(3)+HBV 定量标准品数(4)], 按 20μL 量分装到 n 只 PCR 薄壁管中, 然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

按一定顺序向预混液中分别加入 20μL 的 HBV 阴性质控品、HBV 临界阳性质控品、HBV 强阳性质控品、HBV 定量标准品(1~4)和样本的洗脱液, 盖紧反应管, 转移至 PCR 扩增区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入扩增检测仪器上, 按以下程序进行 PCR 扩增:

步 骤	循 环 数	温 度	时 间
1	1	50℃	2min
2	1	95℃	3min
		94℃	15sec
3	5	55℃	15sec
		72℃	15sec
		94℃	15sec
4	40	60℃(荧光收集)	30sec

检测荧光选择: 目标基因(FAM), 内标(HEX/VIC)

5. 质量控制

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性质控品的最高点或由仪器自动设定。

HBV 强阳性质控品 Ct 值应小于 20; HBV 临界阳性质控品 Ct 值应在 25~30 之间; HBV 阴性质控品 Ct 值无数据且内标 Ct 值 < 40。

标准曲线相关系数应达到 0.98 以上,在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线,否则该次实验视为无效,应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。

【阳性判断值】

根据试剂性能评估研究结果,本试剂盒的检测下限是 5IU/mL。

根据临床样本的研究结果,目标基因 FAM 通道的阳性 Ct 值 <35,内标阳性 Ct 值 <40。

【检验结果的解释】

1. 阴性样本目标基因 (FAM) 未检出 Ct 值,且内标 Ct 值 <40。
2. 检测样本结果 HBV DNA ≥ 5 IU/mL,且内标 Ct 值 <40,则报告为阳性,其中:
 - a. 若检测样本测定值在 15IU/mL $\leq$ HBV DNA $\leq 1.0 \times 10^9$ IU/mL 范围内,可直接报告定量结果。
 - b. 若检测样本 HBV DNA $> 1.0 \times 10^9$ IU/mL,且扩增曲线呈现 S 型,可直接报告为 HBV DNA $> 1.0 \times 10^9$ IU/mL,若需要精确定量,可根据结果对样本适当稀释,使其落入有效范围内,再重新检测。
 - c. 若检测样本测定值介于 5IU/mL $\leq$ HBV DNA < 15 IU/mL 之间,病毒载量过低,检测值仅作定性判定,需谨慎跟踪。
3. 检测样本结果 HBV DNA < 5 IU/mL,且内标 Ct 值 <40,低于本试剂盒检测下限,建议重复检测该样本;如果重复测定值 HBV DNA > 5 IU/mL,可报告阳性结果;如果重复测定值 HBV DNA < 5 IU/mL,则报告结果为低于试剂盒检测下限,结果仅供参考;若内标测定无数值,则该样本的检测结果无效,应当排查原因,重复对该样本检测。

【检验方法的局限性】

1. 本检验方法不能作为临床确诊的依据。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、储存及处理过程均有可能导致错误的检测结果。

【产品性能指标】

1. 阴性符合率:检测 8 份企业阴性参考品 N1~N8,或检测国家阴性参考品,检验结果均为阴性,符合率(-/-)为 8/8。
2. 阳性符合率:检测 9 份企业阳性参考品 P1~P9,或检验国家阳性参考品,检验结果均为阳性,符合率(+/-)为 9/9。
3. 检测限:本试剂盒的产品检测下限为 5IU/mL,最低定量限为 15IU/mL。
4. 精密性:检测 J 高(1.5×10^4 IU/mL)和 J 低(1.5×10^2 IU/mL)企业精密性参考品,每份分别重复检测 10 次,其浓度检出值对数值的变异系数(CV,%) $\leq 5\%$ 。
5. 线性范围:根据性能评估实验,确定本试剂盒线性范围在 15IU/mL $\leq$ HBV DNA $\leq 1.0 \times 10^9$ IU/mL,其线性值 r 满足: $|r| \geq 0.98$ 。
6. 亚型检出能力:本试剂盒对 HBV 病毒 A、B、C、D、E、F、G、H 亚型在检测下限附近均能准确检出。
7. 分析特异性:
 - a. 交叉反应:本试剂盒与丙型肝炎病毒(HCV)、戊型肝炎病毒(HEV)、E-B 病毒、人巨细胞病毒(HCMV)、甲型肝炎病毒(HAV)、单纯疱疹病毒 I 型(HSV-I)、单纯疱疹病毒 II 型(HSV-II)、结核分枝杆菌(TB)、白色念珠菌、金黄色葡萄球菌、人类免疫缺陷病毒、梅毒、甲型流感病毒、痤疮丙酸杆菌和人类疱疹病毒 VI 型均无交叉反应。
 - b. 干扰物:30mg/mL 游离血红蛋白、60mg/mL 甘油三酯、0.6mg/mL 胆红素、40mg/mL IgG、80IU/mL 的类风湿因子及 300U/mL IFN α 、4.5 μ g/mL 拉米夫定、75ng/mL 阿德福韦酯、15 μ g/mL 替比夫定、5ng/mL 恩替卡韦、86 IU/mL IFN α -2a、1000 IU/mL IFN α -2b、39000 IU/mL IFN α -1b、550 IU/mL PEG-IFN α -2a、470 IU/mL PEG-IFN α -2b 对样本检测结果无明显影响。
8. 临床评价:本试剂盒与同类已上市产品对比试验,一共完成 621 例,样本类型为血清,其中阳性 529 例,阴性 92 例。本产品与对比试剂阳性符合率为 99.81% (95%CI: 98.95%~100.00%),阴性符合率为 93.48% (95%CI: 86.34%~97.57%),总符合率为 98.87% (95%CI: 97.69%~99.55%),定量检测结果的回归分析方程为 $y = 0.0316 + 0.9910x$,Spearman 相关系数为 0.9950;针对血浆样本,完成同源血清和血浆样本的对比试验,阳性符合率为 98.18%,阴性符合率为 100.00%,总符合率为 98.33%,定量检测结果的回归分析方程为 $y = -0.0884 + 1.017x$,Spearman 相关系数为 0.9920。

【注意事项】

1. 有关实验室管理规范请严格按照行业行政主管部门颁布的有关基因扩增检验实验室的管理规范执行。
2. 本试剂盒仅用于体外检测,不可用于血源筛查。
3. 试剂盒内校准品、质控品或其他可能含有人源物质的组分,虽已通过乙型肝炎表面抗原(HBsAg)、人类免疫缺陷病毒抗体(抗-HIV1/2)、丙型肝炎抗体(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。
4. 本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
5. 实验室严格分区操作:
 - 第一区:试剂准备区-准备扩增所需试剂;
 - 第二区:样本处理区-待检测样本和质控品的处理;
 - 第三区:PCR 扩增区-PCR 扩增检测。
6. 各区物品均为专用,不得交换使用,避免污染,每次实验完后立即清洁工作台。
7. 使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
8. 反应液分装时应尽量避免产生气泡,上机前注意检查各反应管是否盖紧,以免荧光物质泄露污染仪器。
9. 加样时应使样品完全加入反应液中,不应有样品粘附于管壁上,加样后应尽快盖紧管盖。
10. 扩增完毕请立即取出反应管,密闭在专用塑料袋中,放于指定地点,等待统一处理。
11. 实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内,并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
12. 工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
13. PCR 预混液应避光低温保存。
14. 不同批号的试剂请勿混用,并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

1. 《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. 《临床实验室定量测定室内质量控制指南》
3. 《临床基因扩增检验实验室管理暂行办法》
4. 《慢性乙型肝炎防治指南(2019 年版)》
5. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
6. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology 11:1026-1030.
7. Williams JF. Optimization strategies for the polymerase chain reaction. Biotechniques 1989, 7:762-768.

【基本信息】

注册人/生产企业名称:苏州天隆生物科技有限公司

住所:苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室

联系方式:0512-62525631 传真: 0512-62956337 网址: www.medtl.cn

售后服务单位名称:苏州天隆生物科技有限公司

联系方式:0512-62525631 传真: 0512-62956337 网址: www.medtl.cn

生产地址:苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋(NW-07) 501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋(NW-06) 504 室

生产许可证编号:苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20213400869

【说明书核准日期及修改日期】2021.11.03