

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】32 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定量检测人血清或血浆中的乙型肝炎病毒核酸。

乙型肝炎病毒（hepatitis B virus）是指引起人类急、慢性肝炎的 DNA 病毒,也称丹氏颗粒，传统以检测血清感染标志物来判定乙型肝炎病毒感染，无法对患者乙型肝炎病毒感染复制程度作出判断。乙型肝炎病毒核酸 DNA 定量检测技术使我们对患者体内乙型肝炎病毒复制及传染性有更直接地了解，乙型肝炎病毒 DNA 阳性是表示乙型肝炎病毒复制的最可靠指标，也是反映乙肝的感染状态和治疗效果的重要指标。临床上主要通过对乙型肝炎患者血中乙型肝炎病毒 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。

该试剂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。不推荐作为乙型肝炎感染的判断依据。不得用于血源筛查。

【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，从而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。试剂盒中不仅使用内质控体系，能够有效防止假阴性的结果；同时也使用了 UNG 酶+dUTP 防污染措施，能有效的排除假阳性结果。

【主要组成成分】

1. 乙型肝炎病毒内标模板：内标模板。
2. 乙型肝炎病毒反应混合液：含三羟甲基氨基甲烷、氯化钾、氯化镁、脱氧核苷三磷酸、引物、荧光探针。
3. 酶混合液：含 Taq 酶及 UNG 酶。
4. 乙型肝炎病毒强阳性对照：含灭活后的乙型肝炎病毒血清。
5. 乙型肝炎病毒临界阳性对照：含灭活后的乙型肝炎病毒血清。
6. 阴性对照：含灭活后的乙型肝炎病毒阴性血清。
7. 乙型肝炎病毒定量标准品 1#（ $1.0-5.0 \times 10^3$ IU/mL）：含灭活后的乙型肝炎病毒血清。
8. 乙型肝炎病毒定量标准品 2#（ $1.0-5.0 \times 10^4$ IU/mL）：含灭活后的乙型肝炎病毒血清。
9. 乙型肝炎病毒定量标准品 3#（ $1.0-5.0 \times 10^5$ IU/mL）：含灭活后的乙型肝炎病毒血清。
10. 乙型肝炎病毒定量标准品 4#（ $1.0-5.0 \times 10^6$ IU/mL）：含灭活后的乙型肝炎病毒血清。

注: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。

核酸提取推荐使用艾康生物技术（杭州）有限公司生产的核酸(DNA)提取试剂盒（磁珠法）（浙杭械备 20150133 号）；若采用仪器进行提取，推荐使用艾康生物技术（杭州）有限公司生产的核酸提纯仪（浙杭械备 20150135 号）。

【储存条件及有效期】

试剂盒-20℃±5℃保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂冷冻保存不影响稳定性，但反复冻融不得超过三次。

生产日期及使用期限详见产品标签或外包装盒。

【适用仪器】

ABI7500 型荧光 PCR 扩增仪和 StepOne Plus 荧光 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：血清或血浆
2. 采集：

血清：用一次性的针筒抽取病人静脉血 3mL，置于灭菌的一次性试管中室温自然凝固（不可用肝素抗凝），或 2000-4000rpm 离心 20 分钟，吸取分离出的血清 0.5mL 左右送检。

血浆：用一次性的针筒抽取病人静脉血 3mL，置于灭菌的一次性抗凝管（不可用肝素抗凝），取分离出的血浆 0.5mL 左右送检。

3. 保存和运输：经上述处理后的待测样本可立即用于检测；室温放置不超过 24 小时，2-8℃放置不超过 72 小时，-20℃±5℃保存不超过一年。样本保存不宜反复冻融（不超过三次）。样本运送采用冰壶加冰或泡沫箱加冰袋密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

推荐使用艾康获证的磁珠法提取试剂处理样本，具体步骤见说明书。（注：使用前在裂解液中加入 10 μL/人份乙型肝炎病毒内标模板后再进行样本处理）

2. 试剂配制【试剂准备区】

从试剂盒中取出乙型肝炎病毒反应混合液,在室温下融化并振荡混匀后，瞬时离心。计算所需反应试剂人份数 $n[n=样本数+对照数(3)+定量标准品数(4)]$ ，每人份反应体系配制如下：

组分	乙型肝炎病毒反应混合液	Taq 酶	总体积
体积	19.5 μL	0.5 μL	20 μL

按 n 人份计算上述各试剂的用量，加入适当容积的离心管中，混匀。按 20 μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

按一定顺序向反应液中分别加入 20 μL 的阴性对照、定量标准品、临界阳性对照、强阳性对照及待测样品的提取产物，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 检测区】

将各反应管按一定顺序放入 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循 环 数	温 度	时 间
1	1	25℃	10min
2	1	95℃	3min
3	45	94℃	15sec
		58℃	30sec*

检测荧光选择为目的基因（FAM）和内标（VIC 或 HEX），荧光信号采集点为 58℃。

（*注：由于 ABI7500 仪器软件版本原因，不能设置为 30 sec 的可以设置为 31 sec）

5. 结果分析方法和质控标准

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点。强阳性对照 Ct 值应小于 25；临界阳性对照 Ct 值大于强阳性对照的 Ct 值且小于 45；阴性对照 Ct 值无数据且内标 Ct 值小于 45；标准曲线相关系数应达到 0.980 以上；在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线；同时满足以上要求，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】本试剂盒检测下限是 20IU/mL。

【检验结果的解释】

1. 待测样本测定值在 50IU/mL ≤ 乙型肝炎病毒 DNA ≤ 5.0 × 10⁸ IU/mL 之间，测定结果在线性检测范围内，可直接报告测定结果。
2. 待测样本的测定值乙型肝炎病毒 DNA > 5.0 × 10⁸ IU/mL 时，测定结果判为阳性，但定量结果高于线性检测上限，定量结果不准确，可做适当稀释，使其落入有效范围内再进行检测。
3. 待测样本测定值浓度小于 50IU/mL 且大于 20IU/mL 者，且内标 Ct 值 < 45，测定结果判为阳性（定量检测结果低于线性检测下限，测定值仅供参考）。
4. 待测样本的测定值乙型肝炎病毒 DNA < 20IU/mL 或无 Ct 值，且内标 Ct 值 < 45，则判定为乙型肝炎病毒 DNA 含量低于试剂盒检测下限；若内标 Ct 无数据则该样本的检测结果无效，应重复实验。

【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、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. 灵敏度及线性范围：本试剂盒的产品检测下限为 20IU/mL，定量检测范围为 50IU/mL - 5.0 × 10⁸ IU/mL。
2. 准确度：检测国家标准品中的阳性参考品、阴性参考品及灵敏度参考品，均符合国家要求。
3. 精密度：阴性质控品检测均未检出阳性；临界阳性质控品阳性检出率高于 95%；弱阳性质控品阳性检出率为 100%且 CV 值不大于 5%；强阳性质控品阳性检出率为 100%且 CV 值不大于 5%。
4. 基因型：分别检测乙型肝炎病毒 B、C、D 各基因型，检出限、准确度及精密度指标均符合要求。
5. 特异性
- 1) 交叉反应：本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、痤疮丙酸杆菌 (PA)、金黄色葡萄球菌 (SA)、白色念珠菌 (CA) 均无交叉反应。
- 2) 干扰物质：常用治疗药物 IFN α (2a、2b 和 1b)、聚乙二醇干扰素 α (2a 和 2b)、拉米夫定、阿德福韦酯、恩替卡韦、替比夫定均不会干扰本试剂盒检测。样本中常见干扰物质胆红素、血红蛋白、甘油三酯和 IgG 均不会干扰本试剂盒检测。

【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。
3. 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-待检测样本和对照品的处理
第三区：PCR 检测区-PCR 扩增检测
4. 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。
5. 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。
6. 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
7. 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。
8. 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。
9. 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，并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
10. 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。
11. PCR 反应混合液应避光低温保存。
12. 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. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986 - 994.
5. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology 11:1026 - 1030.
6. 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：艾康生物技术（杭州）有限公司

住所：杭州市西湖区振中路 210 号

联系方式：电话：0571-87775858；传真：0571-87775851

售后服务单位名称：艾康生物技术（杭州）有限公司

联系方式：电话：400-118-2266；传真：0571-87775851

生产地址：杭州市西湖区振中路 210 号；杭州市临安区开源街 8 号 3 幢（仓库地址）

【生产许可证编号】浙食药监械生产许 20120007 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】国械注准 20163401365

【说明书核准及修改日期】核准日期：2021.04.15

修改日期：2022.04.27