

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

大包装，48 人份/盒。

【预期用途】

本产品用于体外定量检测人血清或血浆样品中的乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸（HBV DNA）。

本试剂盒主要用于对抗病毒治疗、慢性 HBV 感染患者进行辅助管理，该检测可用来测量基线 HBV DNA 水平和治疗中的 HBV DNA 水平，从而辅助进行治疗疗效评估。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。本试剂盒不可作为血液或血液制品 HBV 筛查使用。

【检验原理】

本试剂盒利用实时荧光 PCR 技术，以 HBV 基因组中两个高度保守区 S 区和 C 区为靶标，分别设计特异性引物和 FAM 荧光基团探针，对血清或血浆中 HBV DNA 进行定量检测。另外，以人工设计的一段与 HBV 基因组无同源性的寡核苷酸序列作为内标靶标，设计内标特异性引物及 VIC 荧光基团探针，用于对核酸提取和 PCR 扩增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或纯化试剂对待检测样本进行核酸提取后，以试剂盒中提供的 PCR 检测试剂配制成 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，仪器软件系统检测荧光信号，并自动绘制出实时扩增曲线。PCR 扩增曲线的阈循环值（Ct 值）与加入 PCR 反应的起始核酸数量有关，根据定量参考品和 Ct 值实现对未知样本的定量检测。

【主要组成成分】

	组分名称	规格	数量	主要成分
质控品及阳性定量参考品	HBV 阴性质控品	2500 μL/管	1	已灭活的阴性血清或血浆
	HBV 强阳性质控品	2500 μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒、超敏稀释液
	HBV 临界阳性质控品	2500 μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒、超敏稀释液
	HBV 阳性定量参考品 1 (1.0×10 ⁶ IU/mL)	2500 μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒、超敏稀释液
	HBV 阳性定量参考品 2 (1.0×10 ⁵ IU/mL)	2500 μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒、超敏稀释液
	HBV 阳性定量参考品 3 (1.0×10 ⁴ IU/mL)	2500 μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒、超敏稀释液
	HBV 阳性定量参考品 4 (1.0×10 ³ IU/mL)	2500 μL/管	1	含 HBV 目的片段的病毒样颗粒、超敏稀释液
PCR 检测试剂	HBV 内标溶液	250 μL/管	1	含内标片段的病毒样颗粒、内标稀释液
	HBV 反应液 A	1430 μL/管	1	HBV 特异性的引物和探针、MgCl ₂ 、Tris 盐酸缓冲液
	HBV 反应液 B	220 μL/管	1	热启动 Taq 酶（HBV 超高敏）、UDG 酶、dNTPs

注：

（1）不同批号试剂盒的以上成分不可以互换使用。

（2）需自备的试剂：核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20170665 号）

（3）质控品说明：HBV 强阳性质控品、HBV 临界阳性质控品、HBV 阳性定量参考品为含 HBV 目的片段的病毒样颗粒，HBV 阴性质控品为已灭活的阴性血清或血浆，使用时均需进行核酸提取，应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合相关法规要求；可溯源至乙型肝炎病毒核酸国家标准品（300022）。

【储存条件及有效期】

试剂盒-20±5℃保存，有效期 12 个月。

试剂盒 2-8℃保存 15 天，37℃保存 5 天不影响本试剂盒的检测性能。保存期间，请避免反复冻融、开瓶（反复冻融、开瓶次数应在 4 次以内，冻融、开瓶次数在 4 次以内置于-20±5℃可保存 12 个月）；在-20±5℃条件下运输时间在 96 个小时内不影响本试剂盒的检测性能。

本试剂盒生产日期、有效期见本试剂盒的包装标签。

【适用仪器】

ABI 7500, AGS4800。

【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 — 用不含抗凝剂的采血管采集受检者 3~5mL 静脉血，室温（10~30℃）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，1500rpm 离心 15 分钟，上层即为血清。

2.2 血浆 — 用含乙二胺四乙酸盐(EDTA-盐)或枸橼酸钠抗凝剂的采血管采集受检者 3~5mL 静脉血，立即轻轻颠倒真空管混合 5~10 次，使抗凝剂与静脉血充分混匀，将采集的抗凝全血 1500rpm 离心 15 分钟，上层即为血浆。

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。于 2~8℃条件下可保存 15 天。-70℃以下保存期为 1 年，应避免反复冻融。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）

可采用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（备案号：粤穗械备 20170665 号），具体操作步骤请按照试剂盒说明书指引进行。本试剂盒中的内标溶液参与提取过程，用于提取过程及 PCR 扩增全过程的监控，按照提取试剂说明书中说明的使用方法，建议每个测试加入 4 μL 内标溶液后进行核酸提取。

本试剂盒中的 HBV 阴性质控品、HBV 强阳性质控品、HBV 临界阳性质控品和定量参考品均参与提取，用于对环境进行监控和 PCR 检测试剂的质控。提取后的病毒核酸溶液，建议立即使用，如需保存，置于-20±5℃可保存 30 天。

2 PCR 试剂准备（试剂准备区）

从试剂盒中取出 HBV 反应液 A、HBV 反应液 B，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	总体积
用量	26 μL	4 μL	30 μL

将 HBV 反应液 A、HBV 反应液 B 液充分混合，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 30 μL 扩增体系分装到 PCR 管中备用。

3 加样（样本制备区）

用带滤芯吸头往上述 HBV 反应管中分别加入待测样本、HBV 阴性质控品、HBV 阳性质控品和 HBV 阳性定量参考品提取后的核酸，体积为 40 μL，盖紧管盖，瞬时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 7500 仪器设置

- 4.1.1 先开电脑，再开定量 PCR 仪主机电源，最后启动 ABI 7500 软件。
- 4.1.2 新建文件：菜单 File → New Experiment 中选择 Advanced Setup，打开一个空白文件，在“Experiment Name”中编辑实验名。
- 4.1.3 打开“Plate Setup”窗口，点击 Add New Target 按钮，新建探针，探针检测模式设置为：Reporter Dye1: FAM, Quencher Dye1: none, Reporter Dye2: VIC, Quencher Dye2: none；点击“Assign Target Samples”按钮，按样本对应顺序设置阴性质控（NEG）、阳性质控以及未知样本（Unknown）、阳性定量参考品（Standard），并在“Sample Name”一栏中设置样本名称，Passive Reference: none。
- 4.1.4 打开“Run Method”窗口，设置循环条件如下：

Program name	Cycles	Temperature Target (°C)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 2: 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

- 并在“Reaction Volume Per Well”中设置PCR反应体积为70 μL。
- 4.1.5 设置完成后，保存文件，点击“Start the instrument run”按钮，运行程序。
 - 4.1.6 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。
 - 4.1.7 保存结果：程序结束后，自动保存到文件路径。

4.2 AGS4800仪器设置

- 4.2.1 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）。
- 4.2.2 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。
- 4.2.3 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。
- 4.2.4 打开“程序参数”窗口，扩增参数如下：

Program Name	Cycles	Temperature Target (°C)	Running Time	Analysis Mode	Acquisition Mode
1	1	50	00: 2: 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 70 μL。
- 4.2.5 设置完成后，保存文件，运行程序。

5 结果分析(请参照各仪器使用说明书进行设置，以 ABI7500 仪器为例)

- 5.1 反应结束后保存检测数据文件。
- 5.2 分析条件设置：根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 的 Value 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，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 Amplification Plot 界面查看结果。

6 质量控制

- 6.1 阴性质控品：FAM 通道无扩增曲线，VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 Ct≤40；
- 6.2 阳性质控品：FAM 通道扩增曲线呈 S 型曲线，HBV 强阳性质控品定值范围在 3.0×10⁵~3.0 ×10⁶ IU/mL，临界阳性质控品定值

范围在 $3.0 \times 10^2 \sim 3.0 \times 10^3$ IU/mL，VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t \leq 40$ ；
6.3 阳性定量参考品：FAM 通道扩增曲线呈 S 型曲线， $C_t \leq 35$ ，且线性相关系数的 $R^2 \geq 0.98$ ，VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t \leq 40$ ；

以上要求需在同一次实验中同时满足，否则，本次实验无效，需重新进行实验。

7 结果判断

- 7.1 如果 FAM 通道无扩增曲线，VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t \leq 40$ ，则样品 HBV DNA 浓度低于试剂盒检测下限。
- 7.2 如果 FAM 通道扩增曲线呈 S 型曲线，VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t \leq 40$ ，则按以下方法判断：
 - 7.2.1 若样品试验结果为 $20 \text{ IU/mL} \leq C \leq 1.00E+008 \text{ IU/mL}$ ，则该样品的 HBV DNA 浓度= C IU/mL；
 - 7.2.2 若样品试验结果为 $C > 1.00E+008 \text{ IU/mL}$ ，则该样品的 HBV DNA 浓度 $> 1 \times 10^8 \text{ IU/mL}$ ；如果需要精确定量结果，可将样品用已灭活的阴性血清或血浆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；
 - 7.2.3 若样品试验结果为 $2 \text{ IU/mL} \leq C < 20 \text{ IU/mL}$ ，则该样品的 HBV DNA 浓度低于试剂盒定量下限，检测浓度仅作为参考；
 - 7.2.4 若样品的试验结果为 $C < 2 \text{ IU/mL}$ ，则该样品的 HBV DNA 浓度低于试剂盒的检测下限。

【阳性判断值】

根据样本的检测结果，确定本试剂盒的 HBV 判断值为 C_t 值等于 45，内标阳性判断值为 C_t 值等于 40。
阳性判断值的确定采用地域分布于河北、河南、山西、黑龙江、山东、辽宁、甘肃、广东等地区的样本 171 份，其中阳性 138 份，阴性 33 份，根据检测结果进行 ROC 分析，确定 C_t 值 45 为本试剂盒 FAM 检测通道的阳性判断值。根据检测样本结果统计内标 C_t 值，采用 T 检验作为统计学方法，计算 95% 的置信区间上限，确定 C_t 值 40 作为本试剂盒 VIC 检测通道内标的阳性判断值。

【检验结果的解释】

- 1. 每次实验均需检测阴性质控品，阳性质控品和定量参考品，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：FAM 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t < 45$ ，同时 VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t \leq 40$ 。
- 3. 阴性结果判定标准：FAM 通道无扩增曲线，同时 VIC 通道扩增曲线呈 S 型曲线且 $C_t \leq 40$ 。
- 4. 报告建议采用以下格式：
 - 4.1 阴性结果报告格式为：样本未检测到乙型肝炎病毒 DNA，浓度低于试剂盒的检测下限；
 - 4.2 阳性结果报告格式为：
 - 1）当样本的试验结果为 HBV DNA 浓度 $C > 1.00E+008$ 时，报告格式为：样本检测到乙型肝炎病毒 DNA 浓度大于 $1.0 \times 10^8 \text{ IU/mL}$ ，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；
 - 2）当样本的试验结果为 HBV DNA 浓度 $20 \leq C \leq 1.00E+008$ 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；
 - 3）当样本的试验结果为 HBV DNA 浓度 $2 \leq C < 20$ ，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）当样本的试验结果为 HBV DNA 浓度 $C < 2$ ，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。
 - 4.3 若内标通道无扩增曲线，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】

- 1. 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，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。
- 2. 临床实验室应严格按照《临床基因扩增实验室工作规范》配备设备及操作人员，应严格按照说明书要求进行操作。
- 3. 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。
- 4. 本试剂盒适用样本类型为血清、血浆，适用机型为 ABI 7500、AGS4800。

【产品性能指标】

- 1. 灵敏度及定量限：本试剂盒的检测灵敏度为 2IU/mL，定量限为 20IU/mL。通过分析乙型肝炎病毒核酸国家参考品稀释的一系列浓度的检出结果，采用 Sigmoidal Fit 的方法拟合成曲线从而得到检出率为 95% 的浓度来确定本试剂盒灵敏度，定量限通过本试剂盒检测乙型肝炎病毒核酸国家参考品实测浓度与理论浓度对数值差异均在 ± 0.5 范围内的浓度进行确认，并对 HBV 常见型别 B、C、D 基因型血清及血浆样本进行了灵敏度及定量限的验证。
- 2. 精密性：通过使用强阳（ $1 \times 10^5 \text{ IU/mL}$ ）、弱阳（ $1 \times 10^3 \text{ IU/mL}$ ）、临界阳（20IU/mL）3 个不同浓度的 HBV 阳性样本和 HBV 阴性质控品对本试剂盒进行精密性验证，强阳及弱阳浓度样本检测浓度对数值变异系数（CV，%） $\leq 5\%$ ，临界阳浓度样本的检出率为 100%，HBV 阴性质控品均为阴性。实验表明，本试剂盒的不同操作者间、日内和日间、批内和批间重复性好，符合可接受标准。
- 3 线性范围：本试剂盒的线性定量范围为 20IU/mL $\sim 1.0 \times 10^8$ IU/mL，通过临床样本对本试剂盒检出 HBV 线性定量范围进行了确定和验证，检测浓度与理论浓度对数值的相关系数均大于 0.98，各检测浓度与理论浓度对数值差异均在 ± 0.5 范围内。
- 4. 不同基因型的覆盖：根据本试剂盒进行的基因型验证结果，本试剂盒可检测 HBV A、B、C、D、E、F、G、H 各基因型。
- 5. 分析特异性：
 - a. 经测试，本试剂盒与以下感染部位相同或感染症状相似的其他病毒、细菌无交叉反应。

病毒					细菌	酵母菌
人巨细胞病毒 (1.00× 10 ⁷ IU/mL)	人类免疫缺陷病毒 1 型 (1.00× 10 ⁷ IU/mL)	甲型肝炎病毒 (3.00× 10 ⁷ IU/mL)	人类疱疹病毒 6 型 (1.00× 10 ⁷ copies/mL)	单纯疱疹病毒 2 型 (1.00× 10 ⁷ copies/mL)	痤疮丙酸杆菌 (1.00× 10 ⁶ CFU/mL)	白色念珠菌 (1.00× 10 ⁶ CFU/mL)

