

乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒 (荧光PCR法) 说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（荧光PCR法）

【包装规格】

24测试/盒、32测试/盒、48测试/盒、96测试/盒。

【预期用途】

本产品用于定量测定人体血清或血浆中乙型肝炎病毒核酸的含量。

乙型肝炎病毒（Hepatitis B Viral, HBV）属嗜肝DNA病毒科（hepadnaviridae），基因组长约3.2kb，为部分双链环状DNA。HBV感染呈世界性流行，据世界卫生组织报道，全球约20亿人曾感染HBV，其中2.4亿人为慢性HBV感染者，每年约有60万人死于HBV感染所致的肝功能衰竭、肝硬化和肝细胞癌。HBV的实验室检查方法有血清学检测、生物化学检测、HBV DNA、基因型及变异检测。本产品主要通过对接抗病毒治疗的乙肝患者血清或血浆中HBV DNA基线水平和变化情况的监测，评估抗病毒治疗的应答和治疗效果，不得用于血源筛查。本产品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。

【检验原理】

本产品利用针对HBV DNA保守区设计的特异性引物和荧光探针，应用实时荧光定量PCR技术，通过监测荧光信号的变化实现HBV DNA的定量检测，并通过检测HBV内标监测待测样本中是否具有PCR抑制物，可有效防止假阴性测定结果。

【主要组成成分】

组分名称	主要成分	24测试/盒	32测试/盒	48测试/盒	96测试/盒
PCR反应液	引物、探针、dNTP、Mg ²⁺ 、缓冲液	325 μL × 1管	416 μL × 1管	650 μL × 1管	650 μL × 2管
酶混合液	Taq酶、UDG酶	50 μL × 1管	64 μL × 1管	100 μL × 1管	100 μL × 2管
定量校准品1	质粒	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
定量校准品2	质粒	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
定量校准品3	质粒	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
定量校准品4	质粒	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
阴性质控品	超纯水	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
临界阳性质控品	质粒	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
强阳性质控品	质粒	450 μL × 1管	650 μL × 1管	1.0mL × 1管	1.0mL × 2管
HBV内标	质粒	50 μL × 1管	64 μL × 1管	100 μL × 1管	100 μL × 2管

定量校准品标示值见说明书附页，不同批号试剂盒中各组分不能互换。

该检测系统已溯源至国家参考品：乙型肝炎病毒核酸国家参考品。

需配套本公司以下产品使用：

核酸提取或纯化试剂 川蓉械备20180091号

【储存条件及有效期】

-30~-10℃避光保存，有效期21个月。反复冻融次数不超过6次。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

适用于ABI 7500, Roche Lightcycler 480II, 宏石SLAN-96P荧光定量PCR仪。

【样本要求】

1.按样本采集管生产商的标准操作采集血清、EDTA或枸橼酸钠抗凝血浆。不同生产商的采血管由于原材料和添加剂不同，可能导致不同的结果。本产品未对所有可能应用的采血管类型和生产商进行测试，每个实验室需自行判断其使用的采血管和血清分离产品的适用性。

2.采集的待测样本可立即用于检测，样本于2℃~8℃保存不应超过24小时，于-20℃条件下不超过3个月，长期保存应置于-70℃以下，避免反复冻融。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）

1.1取出扩增反应试剂的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，混匀备用；

1.2按照下表配制核酸提取试剂③混合液、PCR混合液：

名称	试剂	用量/测试	测试数
核酸提取试剂③混合液	核酸提取试剂③	8 μL	N=n+7
	HBV内标	2 μL	
PCR混合液	PCR反应液	13 μL	
	酶混合液	2 μL	

注：测试数N=n+7，其中n表示待测样本数量，另7份为阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品以及定量校准品1~4。应根据实验室情况，适当考虑混合液分装过程中的损耗。

1.3将上述准备好的试剂转移至样本处理区，混匀备用。

2. 样本处理（在样本处理区进行）

2.1取待测样本、阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品和定量校准品1~4各200 μL，然后用核酸提取或纯化试剂进行核酸提取；其中核酸提取试剂③，用量为8 μL/测试，HBV内标需参与提取，用量为2 μL/测试，核酸提取试剂①用量为10 μL/测试，核酸提取试剂②用量为300 μL/测试，核酸提取试剂④用量为400 μL/测试，核酸提取试剂⑤用量为100 μL/测试，核酸提取试剂⑥用量为30 μL/测试。具体提取步骤详见核酸提取或纯化试剂说明书。

2.2取PCR反应管N支，分别加入15 μL步骤1.2配制的PCR混合液，以及步骤2.1处理得到的阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品、定量校准品1~4及待测样本核酸各25 μL，盖上管盖，瞬时离心后转移至扩增区。

3. PCR扩增（在扩增区进行，请参照各适用仪器使用说明书进行设置）

3.1将PCR反应管放入仪器样品槽，按顺序设置阴性质控品、临界阳性质控品、强阳性质控品、定量校准品1~4及待测样本，并设置样本名称及定量校准品浓度。

3.2荧光检测通道选择（以ABI 7500仪器为例）：

· 检测通道设置为FAM（Reporter: FAM, Quencher: None）；

· HBV内标设置为HEX或VIC（Reporter: VIC, Quencher: None）；参比荧光设置为ROX（Passive Reference: ROX）。

3.3反应体系：40 μL。

3.4循环参数设定：

步骤		温度	时间	循环数
1	UDG酶反应	25℃	3min	1
2	Taq酶活化，预变性	95℃	5min	1
3	变性	95℃	15sec	40
	退火，延伸，荧光采集	60℃	30sec	
4	仪器冷却	40℃	10sec	1

注：若仪器无法设置25℃，可取消“UDG酶反应”步骤。

3.5设置完毕，保存文件，运行反应程序。

4. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置）

反应结束后自动保存结果，对HBV的曲线和相应HBV内标的曲线进行分别分析。根据分析后图像调节基线的Start值、End值以及Threshold值（用户可根据实际情况自行调整，Start值可设在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Analyze进行分析，使Standard curve窗口下的标准曲线图达到最佳，然后到Plate窗口下记录定量结果，单位为IU/mL。

5. 质量控制

同一次实验需同时满足5.1~5.4，否则该次实验无效，需重新进行。

5.1定量校准品1~4：均检测为阳性，且标准曲线相关系数 $R^2 \geq 0.980$ 。

5.2 HBV阴性质控品：无Ct值显示；HBV内标显示为阳性，且Ct ≤ 38。

5.3 HBV临界阳性质控品：应检测为阳性。

5.4 HBV强阳性质控品：检测浓度介于 $5.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ IU/mL。

【检验结果的解释】

1.对于测定值 < 20 IU/mL的样本，同时内标检测Ct值 ≤ 38，表示被测样本中无HBV DNA或浓度低于该试剂最低检出量，报告HBV DNA含量低于试剂盒检测下限；若内标检测Ct值 > 38 或无数值，样本需要重新检测或稀释后重新检测。

2.对于测定值 $20 \sim 1.0 \times 10^2$ IU/mL的样本，同时内标检测Ct值 ≤ 38，表示被测样本中HBV DNA的浓度低于定量线性范围，可报告为HBV DNA $< 1.0 \times 10^2$ IU/mL，定量值仅供参考；这部分样本（实际浓度低于

20IU/mL的样本) 重复检测时有一定的机率无数值。若内标检测Ct值>38或无数值, 样本需要重新检测或稀释后重新检测。

3.对于测定值在 $1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ IU/mL的样本, 报告相应的测定结果。

4.对于测定值 $> 1.0 \times 10^9$ IU/mL的样本, 表示被测样本中HBV DNA浓度超出定量检测线性范围上限。可报告为HBV DNA $> 1.0 \times 10^9$ IU/mL; 也可将该样本稀释1000倍再复检, 报告结果应以稀释倍数进行校正。

【检验方法的局限性】

1.本产品的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, 为达到诊断目的, 此检测结果要与临床检查、病史和其它检查结果结合使用。

2.样本检测结果与样本采集、转运、储存及处理过程有关, 其中任何失误都可能会导致结果不准确。如果样本处理时没有适当控制交叉污染, 可能出现假阳性结果。

3.该试剂盒在设计时选择了病原体核酸相对保守的片段进行扩增及检测, 但病原体基因都存在变异的可能, 尽管选择扩增检测的保守区发生变异的几率非常小, 但理论上无法完全避免这种可能性。

4.该检测仅限于规定的样本类型及适用仪器。

【产品性能指标】

1.检测乙型肝炎病毒核酸国家参考品及国家标准品, 符合要求。

2.最低检出量: 20IU/mL, 定量限: 1.0×10^2 IU/mL。(用已知浓度的国家参考品稀释测得, 并通过B、C、D基因型验证)

3.准确度

3.1检测国家参考品或经国家参考品标化的企业参考品, 阴性符合率(-/-)为8/8;

3.2检测国家参考品或经国家参考品标化的企业参考品, 阳性符合率(+/-)为9/9;

3.3检测国家标准品或经国家标准品标化的企业参考品, 检测值与靶值的绝对偏差不超过 ± 0.5 个对数数量级。

4.精密度:

4.1检测 1×10^3 IU/mL和 1×10^5 IU/mL的样本, 批内精密度应符合变异系数(CV, %) $\leq 5\%$ 。

4.2采用精密度评价用阴性质控品、临界阳性质控品、弱阳性质控品和强阳性质控品进行检测, 连续20天, 每天由2人在不同实验室的同一型号不同仪器上各完成1次完整检测, 结果均符合如下要求:

质控品	浓度	结果
阴性质控品	不含待测物	结果均为阴性($n \geq 20$)
临界阳性质控品	待测物浓度略高于试剂盒的最低检出量: 50IU/mL	阳性检出率为100%
弱阳性质控品	待测物浓度高于定量限浓度1个数量级): E+03IU/mL	阳性检出率为100%且变异系数(CV) $\leq 5\%$ ($n \geq 20$)
强阳性质控品	待测物浓度为E+05IU/mL	阳性检出率为100%且变异系数(CV) $\leq 5\%$ ($n \geq 20$)

5.线性范围: 检测国家标准品($1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^8$ IU/mL)或经国家参考品标化的企业参考品($1.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^9$ IU/mL), 线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。

6.对不同基因型的覆盖: 可检测HBV的A~H亚型样本。(经采用SeraCare Life Sciences的Worldwide HBV DNA performance Panel (Lot Number: 121977) 验证)

7.分析特异性:

7.1临床特异性: 采用临床HBV DNA阴性样本进行检测, 阴性符合率为100.00%。

7.2交叉反应: 对HIV、HCV、EBV、HSV-1、HSV-2、CMV、甲型肝炎病毒、梅毒、甲型流感病毒的检测均为阴性。

7.3样本中血红蛋白 ≤ 10 g/L、甘油三酯 ≤ 35 mmol/L、胆红素 $\leq 725 \mu$ mol/L、总IgG浓度 ≤ 30 g/L、EDTA ≤ 20 mg/mL, 对本产品的测定结果无明显影响。

7.4样本中阿德福韦酯 $\leq 50 \mu$ g/mL、拉米夫定 $\leq 500 \mu$ g/mL、恩替卡韦 $\leq 18 \mu$ g/mL、替比夫定 $\leq 9 \mu$ g/mL, 对本产品的测定结果无明显影响。

8.临床研究: 采用已上市产品进行比对试验, 对560例样本进行定性分析, 阴性符合率为92.31%, 阳性符合率为98.99%, 总符合率为98.21%。一致性分析Kappa系数=0.913, 显示两种试剂具有高度一致性(Kappa > 0.8)。对线性范围内的476例样本进行线性回归分析, 线性回归方程为 $y = 0.9502x + 0.02330$, $R^2 = 0.9516$, 表明两种试剂检测结果具有显著的相关性。

【注意事项】

1.使用前请仔细阅读本说明书。

2.实验前请先熟悉和掌握需要使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。

3.实验室应严格按照《医疗机构临床基因扩增检验实验室管理办法》等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, 实验人员必须进行专业培训, 实验过程严格分区进行, 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。

4.本产品含化学成分, 应避免误食或接触皮肤及粘膜。如果不慎将本品溅入眼睛、口中或粘到皮肤, 请用大量流水冲洗, 必要时请就医。

5.所有检测样本应视为具有传染性物质, 实验过程中穿工作服, 戴一次性手套并经常更换手套以避免样本间的交叉污染; 用户在使用本产品过程中所产生的废弃物应集中收集处理后交给当地环保部门确认的废弃物处理机构进行最终处理。

6.所有试剂在使用前, 均需在室温下充分融化、混匀。建议对试剂的冻融不超过6次。酶混合液易粘着于管壁, 使用前请瞬时离心数秒。

7.本产品仅供体外诊断使用。

【标识的解释】

符号或图形	释义
	避光保存
	储存温度
	体外诊断医疗器械
	向上
	废弃后请扔垃圾桶
	可回收材料
	查阅使用说明
	批号
	货号
	失效日期
	生产日期
	生产企业
	医疗器械唯一标识

【参考文献】

1.慢性乙型肝炎防治指南, 2015年版;

2.李金明, 实时荧光PCR技术, 2007, 人民军医出版社。

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 迈克生物股份有限公司

住所: 成都市高新区百川路16号

联系方式: +86 28 8782 6777

售后服务单位名称: 迈克生物股份有限公司

联系方式: 400 6028 007

生产地址: 成都市高新区百川路16号

生产许可证编号: 川药监械生产许20150064号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

国械注准20193400557

【说明书核准及修改日期】

核准日期: 2020年7月24日

修改日期: 2024年1月23日