

乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒（PCR-荧光探针法）

【包装规格】

32 测试/盒、96 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于定量检测人血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒核酸（HBV DNA）。

用于评估抗病毒治疗的应答和治疗效果监测。

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实验室检测指标对病情进行综合分析。

本试剂盒不得用于血源筛查。

【检验原理】

本试剂盒采用荧光 TaqMan PCR 技术，在 HBV 基因组高度保守的基因片段上设计特异引物和 TaqMan 探针，通过检测扩增过程中荧光报告基团发出的荧光强度，实时监测 PCR 产物的数量。

本试剂盒采用内标法定量，将一定量的内标加入至每个样本管中，与样本中的靶标核酸一同提取、扩增。由于各管中初始加入的内标量是相同的，可以通过内标 Ct 值的变化反映管间核酸提取及扩增的差异，从而对靶标的初始浓度定值进行补偿，通过内标与目标基因扩增的 Ct 值差（ ΔCt ）和预先测得的标准曲线来获得样本中靶标的起始浓度。同时，通过检测内标能够监测样本中是否有 PCR 抑制物，避免假阴性结果的发生。

本试剂盒采用 UNG-dUTP 防污染措施，利用 UNG 酶将反应管中可能存在的前次扩增产物污染充分降解，以排除由此引起的假阳性检测结果。

【主要组成成分】

组分名称	主要成分	规格	
		32 测试/盒	96 测试/盒
[HBV PCR 反应液]	<1%引物，<1%探针，<5%Taq 酶，<5%UNG 酶， <10%MgCl ₂ ，<1%dNTPs（含 dUTP）	800μL×1 支	800μL×3 支
[HBV 内标]	内标 DNA 假病毒，Ct 值范围 20≤Ct≤30	960μL×1 支	960μL×3 支
[阴性对照]	HBV DNA 检测为阴性的血清或血浆，防腐剂	800μL×1 支	800μL×3 支
[HBV 弱阳性对照]	HBV DNA 假病毒，31.6~3.16×10 ² IU/mL	800μL×1 支	800μL×3 支
[HBV 强阳性对照]	HBV DNA 假病毒，3.16×10 ⁴ ~3.16×10 ⁵ IU/mL	800μL×1 支	800μL×3 支

注：1、不同批次的试剂盒各组分不可以互换。

2、需要但未提供产品：核酸提取试剂（备案证号：沪徐械备 20200001 号）。需使用者自备。

【储存条件及有效期】

- 1 本试剂盒应在-20±5℃避光储存，有效期为12个月。
- 2 未使用完的试剂在-20±5℃继续避光储存30天不影响其稳定性，但反复冻融次数不得超过3次。试剂盒在2~8℃暂存不应超过7天。
- 3 生产日期及有效期见标签。

【适用仪器】

适用于 ABI 7500 实时荧光 PCR 仪。

【样本要求】

- 1 样本类型：人血清或血浆。
- 2 样本采集与处理：按《人类血液样本采集与处理》（GB/T 38576-2020）进行样本采集和处理。
 - 血清样本
 - 采集：采用静脉穿刺法将受检者静脉血注入普通采血管（无添加剂采血管）或含促凝剂采血管中。
 - 处理：根据采血管种类室温静置5min~60min，然后1500g~2000g离心10min，转移上清至冻存管中，即为血清样本。

➤ 血浆样本

采集：采用静脉穿刺法将受检者静脉血注入含抗凝剂采血管（抗凝剂可采用EDTA或枸橼酸钠，避免使用肝素类抗凝剂）中，抽血后立即颠倒混匀5次~8次。

处理：1500g~2000g离心10min，转移上清至冻存管中，即为血浆样本。

- 3 存放与运送：血清或血浆样本在室温（10~30℃）下至多保存24小时、2~8℃下至多保存72小时、-20±5℃至多保存6个月、-70℃及以下保存至多1年。血清或血浆样本在冷冻保存时避免反复冻融，最大允许反复冻融次数为5次。
- 4 样本用量：单次检测样本用量为400μL。

【检验方法】

1 样本处理（在样本处理区进行）

待测样本核酸提取采用已获得备案证的核酸提取试剂盒，使用上海科华生物工程股份有限公司的核酸提取试剂（备案证号：沪徐械备 20200001 号），使用该核酸提取试剂盒在配套的全自动核酸提取工作站上进行核酸提取。

每次提取需要分别加入 400μL 待测样本和 30μL [HBV 内标]，试剂盒内对照品（[HBV 强阳性对照]、[HBV 弱阳性对照]、[阴性对照]）须与待测样本共同提取，提取过程请严格按照其说明书进行。

2 核酸扩增

2.1 PCR试剂准备（在试剂准备区进行）

取试剂盒中[HBV PCR 反应液]室温融化混匀后，低速（1500g~2000g）离心数秒，转移到样本处理区。

2.2 加样（在样本处理区进行）

经全自动核酸提取工作站提取的样本由自动化移液平台完成 HBV PCR 反应液的分装、加样，每个反应加入 25μL HBV PCR 反应液和 25μL 核酸模板。取出 PCR 板贴膜后转移至扩增检测区。

2.3 PCR扩增检测（在扩增检测区进行）

2.3.1 将反应管或反应板放入荧光PCR扩增仪进行扩增检测。

2.3.2 循环参数设定：（请参照仪器的操作软件进行设置）

步骤	温度	时间	循环数
1	25℃	5分钟	1
2	50℃	25分钟	1
3	95℃	2分钟	1
4	95℃	10秒	5
	55℃	20秒	
	72℃	20秒	
5	95℃	10秒	40
	60℃	45秒	
步骤5中60℃时采集荧光，检测通道：HBV DNA（FAM）、内标（ROX）。			

2.3.3 样本设置，在仪器软件的相应样本设置窗口内填写各样本的名称、类型。

3 检验结果

3.1 根据仪器的软件进行定量分析，得到各样本的检测结果（根据不同的仪器、样本检测的具体情况设置基线，阈值线选在阴性对照正常扩增曲线的上方；也可由仪器自动选择，优先考虑仪器自动选择）。

3.2 根据试剂盒标曲附页中的线性方程进行样本浓度的计算（具体参数见试剂盒中的附页）；将样本靶标Ct值减去内标Ct值得到ΔCt，强阳性对照的ΔCt减去附页中提供的校正参数ΔG得到矫正值，本次实验中所有样本的ΔCt减去矫正值得到矫正后的ΔCt，将矫正后的ΔCt代入方程式（Y=aX+b）中计算得到样本浓度的对数值Y，然后换算为样本的浓度值IU/mL（浓度值=10^Y）。

4 质控标准

4.1 阴性对照：检测结果应为阴性，且内标Ct在20≤Ct值≤30范围内。

4.2 HBV强阳性对照：检测浓度值为3.16×10⁴~3.16×10⁵IU/mL。

4.3 HBV弱阳性对照：检测浓度值为 $31.6\sim 3.16\times 10^2$ IU/mL。

4.4 应同时满足上述3项条件，否则试验无效。

【阳性判断值或参考区间】

通过参考值的研究试验确定，HBV DNA 检测 Ct 值 <40 ，内标 Ct 的检测值在 $20\leq Ct$ 值 ≤ 30 。

【检验结果的解释】

检测结果	结果判定
无数值且内标无数值	检测结果无效，需要复测或稀释后复测。
无数值且内标 Ct 在 $20\leq Ct$ 值 ≤ 30 范围内	未检出 HBV DNA 或样本中 HBV DNA 含量低于试剂盒检出限。
<10 IU/mL，且有数值	低于试剂盒定量检测线性范围下限，所测定量结果仅供参考，报告上注明 <10 IU/mL，检出 HBV DNA。
$10\sim 1.0\times 10^9$ IU/mL	直接报告阳性及相应的病毒载量。
$>1.0\times 10^9$ IU/mL	高于试剂盒定量检测线性范围上限，所测定量结果仅供参考，报告上注明 $>1.0\times 10^9$ IU/mL。若需准确定量，可根据检测结果，将该样本用 HBV DNA 阴性血清或血浆稀释至线性范围后复测。

【检验方法的局限性】

1. 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。
3. 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。
4. 该检测仅限于本说明书中提及的样本类型及适用机型。

【产品性能指标】

1. 外观：外包装完好无破损。试剂盒内液体组分齐全，密封良好，无漏液现象。标签及说明书齐全，字迹清楚。
2. 阴性参考品符合率：检测HBV DNA国家参考品中的阴性参考品或企业阴性参考品各共8份，阴性符合率8/8，不得出现假阳性。
3. 阳性参考品符合率：检测HBV DNA国家参考品中的阳性参考品共9份，阳性符合率9/9，不得出现假阴性；或检测10份企业阳性参考品，阳性符合率10/10，不得出现假阴性。
4. 检出限：5 IU/mL；定量限：10 IU/mL。检出限/定量限是通过分析WHO HBV DNA国际标准品（基因型A，NIBSC 代码：10/266）制备的系列浓度样本来确定，检出限/定量限验证了HBV A、B、C、D、E、F、G、H基因型的样本。
5. 精密度：检测HBV DNA国家参考品中的精密性参考品或企业精密度参考品的高（ 5.0×10^4 IU/mL）、低浓度（ 5.0×10^2 IU/mL）稀释样，各检测10次，均为阳性，且各浓度水平检测浓度对数值的变异系数 $CV\leq 5\%$ 。在精密度的性能评估中，对4个浓度水平的精密度样本各进行80次重复检测，分别对批内、批间、日内、日间以及人员间的精密度进行评价，检测结果表明符合精密度的性能要求。
6. 线性范围： $10\sim 1.0\times 10^9$ IU/mL。检测HBV DNA国家标准品稀释样和/或企业线性参考品稀释样，在试剂盒线性区间内，线性相关系数 $|r|\geq 0.980$ 。线性范围建立时采用临床高值样本配制较预期线性区间更宽的11个不同浓度的样本重复检测，验证时配制覆盖整个线性区间的9个不同浓度的样本重复检测，根据线性相关系数（r）及准确度偏差，确定了线性范围。
7. 准确度：检测HBV DNA国家标准品稀释样和/或企业线性参考品稀释样，结果均为阳性，各稀释浓度值的准确度要求理论值与实测值的对数值绝对偏差在 ± 0.5 的范围内。
8. 对不同基因型的覆盖：本试剂盒可以检测HBV A、B、C、D、E、F、G、H基因型，基因型A-H经过了商业样本验证，临床研究中进行了B、C、D型基因型的检测验证。
9. 特异性
 - 1) 交叉反应：试剂盒对甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒（1型、2型）、人乳头瘤病毒（16、18型）、单纯疱疹病毒（1型、2型）、E-B病毒、人巨细胞病毒、梅毒螺旋体、金黄色葡萄球菌、白色念珠

菌、甲型流感病毒（H1N1）、痤疮丙酸杆菌、人类疱疹病毒6型均无特异性扩增。

- 2) 干扰物质：样本中胆红素浓度低于0.2g/L，血红蛋白浓度低于2g/L，甘油三酯水平浓度30g/L，总IgG浓度低于20mg/mL，聚乙二醇干扰素 α -2b浓度低于30ng/mL，干扰素IFN α -2a浓度低于7ng/mL，拉米夫定浓度低于5 μ g/mL，阿德福韦酯浓度低于55ng/mL，恩替卡韦浓度低于25 ng/mL，替比夫定浓度低于15 μ g/mL对本试剂盒HBV DNA的定量检测没有干扰。
10. 临床评价：本产品在3家临床检验机构进行临床试验，共纳入509例样本，本产品与比对试剂的阳性符合率100.00%、阴性符合率95.00%、总符合率 99.41%。

【注意事项】

1. 本试剂盒为体外诊断试剂，仅供体外诊断。
2. 肝素抑制PCR反应，以血浆作为待测样本时避免使用肝素抗凝管。
3. 实验时应穿工作服，戴一次性手套（经常替换手套），使用一次性用品。
4. 试剂盒各组分使用前请充分融化并摇匀。
5. 样本采集及储存过程避免样本间交叉污染，在样本处理阶段建议使用生物安全柜。
6. 操作过程中用到的生物安全柜、移液器、离心管、扩增仪等仪器设备推荐用75%乙醇进行消毒，操作过程中用到的工作台面推荐使用0.1~1%的次氯酸溶液消毒^[5]。
7. 试剂盒内阴性对照或其他可能含有人源物质的组分，虽已经通过了HBsAg、HIV1/2抗体、HCV抗体项目的检测，使用PCR技术未检测到HBV DNA、HCV RNA、HIV RNA，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。
8. 实验室管理应严格按照国家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；实验过程应分区进行（试剂准备区、样本处理区、扩增检测区），实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不得交叉使用；各区间人员流动及空气流向应有严格要求，最大限度避免交叉污染；实验用消耗品（如离心管、吸头等）应有合理的清洁和质检程序，避免污染或扩增反应抑制物造成假阴性结果。
9. 本试剂盒内含叠氮钠组分，叠氮钠可与铅和铜管道设备发生反应从而形成易爆的金属叠氮化合物。因此在将其冲入下水道时，使用大量水冲洗排水设备防止叠氮化合物积累。

【参考文献】

1. Kim H, Hur M, Bae E, Lee KA, Lee WI. Performance evaluation of cobas HBV real-time PCR assay on Roche cobas 4800 System in comparison with COBAS AmpliPrep/COBAS TaqMan HBV Test. Clin Chem Lab Med. 2018 Feb 19.
2. Prakash S, Jain A, Jain B. Development of novel triplex single-step real-time PCR assay for detection of Hepatitis Virus B and C simultaneously. Virology. 2016 Feb 22.
3. Jia S, Wang F, Li F, Chang K. Rapid detection of hepatitis B virus variants associated with lamivudine and adefovir resistance by multiplex ligation-dependent probe amplification combined with real-time PCR. J Clin Microbiol. 2014 Feb;52(2):460-6.
4. Li WJ, Xu HX, Wu DS, Wu YJ, Xu WD. A novel fully automated system for quantification of Hepatitis B Virus DNA using magnetic bead-based method combined with Real-time PCR. J Virol Methods. 2017 Jul 04.
5. 全国艾滋病检测技术规范（2009年修订版）第八章 实验室生物安全. 中国疾病预防控制中心, 2009.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：上海科华生物工程股份有限公司
住所：上海市徐汇区钦州北路 1189 号
联系方式：
售后服务单位名称：
联系方式：
生产地址：上海市徐汇区桂平路 701 号
生产许可证编号：

【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】

附页：HBV IC (MDX)标准曲线 $Y=aX+b$ 系数和校正参数	
批号：	
系数 a	
系数 b	
校正参数 ΔG	