

乙型肝炎病毒核酸（DNA）检测试剂盒（荧光 PCR“一管法”）说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒核酸（DNA）检测试剂盒（荧光 PCR“一管法”）

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本产品用于定量检测人血清、血浆样本中的 HBV DNA。

本产品采用实时荧光定量 PCR 扩增检测技术，通过微量核酸释放剂，在一管中完成样本提取与扩增。适用于疑似感染者乙型肝炎的辅助诊断以及接受抗病毒治疗中的疗效观察，可通过对血液中 HBV DNA 基线水平和变化情况的检测进行监测。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监测对病情进行综合分析。本试剂不用于血源筛查。

【检验原理】

本产品采用微量核酸释放剂快速裂解、释放血清或血浆样本中的 HBV DNA，利用针对 HBV 核酸保守区设计的一对特异性引物、一条特异性荧光探针，配以 PCR 反应液，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现 HBV DNA 的定量检测。

本试剂盒系采用微量核酸释放剂，可在一管中进行 HBV DNA 核酸提取与扩增，对 5ul 的微量样本直接进行快速、准确定量检测；微量核酸释放剂在完全释放核酸的同时，还具有封闭样本中对 PCR 扩增具有干扰作用的蛋白质、药物及溶血等各种因素物质的功能，避免检测结果的错误。

此外，标准质控品与待测样本同步提取和扩增，避免反复离心和开盖所引起的污染和核酸丢失，实现 PCR 检测的“一步法”和“一室化”操作。

【主要组成成分】

序号	产品组成	主要组成成分
1	核酸释放剂	蛋白酶 K，曲拉通 X-100
2	HBV PCR 反应液	HBV 引物及探针、内标引物及探针、氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸
3	HBV 内标	质粒
4	酶混合液	TaqDNA 聚合酶，尿嘧啶-N-糖基化酶
5	促释放剂	盐酸
6	HBV 阴性对照品	阴性血清/血浆
7	HBV 阳性对照品	阳性血清/血浆
8	HBV 定量参考品 A	阳性血清/血浆
9	HBV 定量参考品 B	阳性血清/血浆
10	HBV 定量参考品 C	阳性血清/血浆

序号	产品组成	主要组成成分
11	HBV 定量参考品 D	阳性血清/血浆

注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换。

注 2：试剂盒以外的必需设备及材料：荧光定量 PCR 仪、普通 PCR 仪、漩涡振荡器、生物安全柜、迷你离心机、移液器及带滤芯的吸头(无菌)、PCR 样品反应管、无粉乳胶手套、无菌石蜡油。

注 3：内标模板与靶基因无同源性。

注 4：试剂盒内的生物样本均已经灭活处理；HBV 定量参考品 A~D 的具体浓度请参照试剂盒内给定值。

【储存条件及有效期】

试剂盒在-20±5℃避光保存，有效期为 8 个月。

产品生产日期与失效日期见标签。

试剂盒各组分反复冻融不宜超过三次，开瓶后请于一个月内使用。

运输稳定性要求：采用冰壶或干冰密封或泡沫箱加冰密封运输，且到货后按照-20±5℃条件下保存，产品可稳定保存至产品效期末。

【适用仪器】

适用于 ABI7500、Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1.适用样本类型：血清、血浆。

2.样本采集

2.1 血清样本采集：

用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3~5ml，注入无菌收集管，室温放置不超过 4 小时，待样本自行析出血清或室温 1600rpm 离心 5 分钟分离出血清，转移到 1.5ml 灭菌离心管中备用。

2.2 血浆样本采集：

用无菌注射器在受检者手臂弯曲处或手背处抽取静脉血 3~5ml，注入含有 EDTA 或枸橼酸钠抗凝的无菌收集管中，并立即轻轻颠倒混匀，室温放置不超过 4 小时，待样本自行析出血浆或室温 1600rpm 离心 5 分钟分离出血浆，转移到 1.5ml 灭菌离心管中备用。

注：肝素可能会抑制 PCR 反应，本试剂盒不适用于含有肝素的血浆样本的检测。

3.样本保存和运输：

经上述处理后的待测样本可立即用于检测，若不立即检测，可在 2~8℃保存 72 小时，-20±5℃保存 3 个月，长期保存请置于-70℃以下，为了避免多次取用过程中的错误操作造成样本损坏，请避免反复冻融；样品运输请采用不易碎的容器(如冰壶或泡沫箱)加冰装载样本密封进行运输，避免样本运输途中解冻。样本应视作潜在传染源，在使用、保存及运输过程中避免外漏。

4.核酸提取：请遵照说明书内容采集、处理样本，并结合后续检验结果进行分析。

【检验方法】

1. 试剂准备(在试剂准备区进行)

1.1 取出试剂盒中各组分，待其充分溶解并恢复室温后混匀瞬时离心。
1.2 根据待测样本、HBV 阴性对照品、HBV 阳性对照品、HBV 定量参考品 A~D 的数量，准备相应量的 PCR 反应管备用。

1.3 根据待测样本、HBV 阴性对照品、HBV 阳性对照品、HBV 定量参考品 A~D 的数量，按比例（HBV PCR 反应液 33ul/人份+内标 1ul/人份+酶混合液 1ul/人份）取相应量的 HBV PCR 反应液、内标、酶混合液，充分混匀成 PCR-mix，瞬时离心后备用。

2. 样本处理(在样本处理区进行)

2.1 取 5ul 核酸释放剂，加入 PCR 反应管中。

2.2 分别取待测样本、HBV 阴性对照品、HBV 阳性对照品、HBV 定量参考品 A~D 各 5ul 加入对应的 PCR 反应管中，并用移液器在管底吹打混匀 10 次（吹打后建议加入 30ul 无菌石蜡油）。

2.3 盖好管盖，将 PCR 反应管放置在普通 PCR 仪中进行反应。参数设定如下：

温度	时间
95℃	10 分钟
4℃	2 分钟

2.4 将经过裂解处理后的 PCR 反应管从普通 PCR 仪中取出，小心打开管盖，每管加入 2.5ul 促释放剂，并用移液器在管底吹打混匀 15~20 次。

2.5 每管悬空加入 35ul 的 PCR-mix，瞬时离心 30s。

3. PCR 扩增(在扩增与分析区进行)

将离心后的 PCR 反应管放入荧光 PCR 检测仪样品槽，按照对应顺序设置阴性对照、阳性对照、定量参考品 A~D 以及未知样本，并设置样品名称及定量参考品浓度，记录样本摆放顺序。

3.1 PCR 扩增程序设置：

3.1.1 ABI7500 型荧光定量 PCR 仪

1) 仪器操作请参照仪器说明书。

2) 靶基因选择 FAM 通道；内标选择 VIC 通道。

3) 循环参数设置见下表：

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	45
4	退火，延伸，及荧光采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

3.1.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

1) 仪器操作请参照仪器说明书。

2) 靶基因选择 FAM 通道；内标选择 HEX 通道。

3) 循环参数设置见下表：

序号	步骤	温度	时间	循环数
1	UNG 酶反应	50℃	2 分钟	1
2	预变性	95℃	5 分钟	1
3	变性	95℃	15 秒	45
4	退火，延伸，及荧光采集	60℃	45 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

4. 结果分析条件的设定

4.1 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据 PCR 仪说明书及荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整时，基线(Baseline)的起始点(Start)设定在 3~8 之间，终止点(Stop)设定在 12~15 之间，阈值线(Threshold)通常设定在 1000~5000 之间(视具体情况而定)。

4.2 Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪

反应结束后，根据荧光曲线进行手动或自动调整基线和阈值。手动调整基线(Non-adaptive baseline)的起始点(Start)一般设定为 5~8，终止点(Stop)一般设定为 12~15，阈值线(Threshold fluorescence)通常设定在 500~2000 之间(视具体情况而定)。

【阳性判断值】

1. 内标：内标通道应出现标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 。

2. HBV 阴性对照品：靶基因通道无标准扩增曲线或无 Ct 值显示；内标通道有标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 。

3. HBV 阳性对照品：靶基因通道出现标准扩增曲线，且检测浓度值介于 $1.0 \times 10^5 \sim 1.0 \times 10^6$ IU/ml 之间；内标通道有标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 。

4. HBV 定量参考品 A~D：靶基因通道均出现标准扩增曲线，且标准曲线相关系数 $|r| \geq 0.980$ ；内标通道有标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 。

5. 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。

【检验结果的解释】

1. 若靶基因通道没有出现标准扩增曲线，同时内标通道出现标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 之间，判为 HBV DNA 检测阴性。

2. 对于测定值在 $300 \sim 2.5 \times 10^9$ IU/ml 之间的样本，靶基因通道出现标准扩增曲线，同时内标通道出现标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 之间，则报告相应的测定结果。

3. 对于测定值 $> 2.5 \times 10^9$ IU/ml 的样本，靶基因通道出现标准扩增曲线，同时内标通道出现标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 之间，报告注明 $> 2.5 \times 10^9$ IU/ml。若需精确定量，可根据结果将样本稀释至 2.5×10^9 IU/ml 以下再复测，并根据以下公式计算样本浓度，结果注明可报告数值。

可报告数值（最终样本浓度）= 稀释浓度 × 稀释倍数

稀释倍数=（样本量+稀释液量）/样本量

4.对于测定值在 30~300IU/ml 的样本，靶基因通道出现标准扩增曲线，同时内标通道出现标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ ，表明病毒载量低，测定值仅供参考。

5.对于测定值 <30IU/ml 的样本，内标通道出现标准扩增曲线，且 $16 \leq Ct \leq 35$ 之间，则报告 HBV-DNA 含量低于试剂盒检测下限，应结合其他临床诊断指标进行判断。

6.若内标通道 $Ct > 35$ 或无扩增曲线出现，则该样本检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重复检测。

【检验方法的局限性】

1.HBV 病毒基因型多，变异快，本检测方法对 HBV 各基因型的灵敏度可能存在差异，但从中国药品生物制品检定研究院乙型肝炎病毒(HBV)核酸定量标准品的检测结果判断，差异均在可控范围之内。

2.扩增产物的污染和核酸提取中样本间的交叉污染，很容易出现错误结果。因此，PCR 临床应用必须要有严格的实验室分区、实验室管理和质量控制措施。

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/特征、病史、其他实验室检查及治疗反应等情况综合考虑。

4.样本检测结果与样本的收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现错误结果。

5.本试剂盒仅用于血清或血浆样本检测，适用仪器为 ABI7500、Stratagene Mx3000P 型荧光定量 PCR 仪。

【产品性能指标】

1.国家参考品符合情况：国家参考品中阴性参考品 N1~N8 检测均为阴性；阳性参考品 P1~P9 检测均为阳性；灵敏度参考品 L0~L5 检测均为阳性，且线性相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。

2.最低检出限和定量限：本试剂对不同浓度水平 HBV 阳性样本检测。确定定量限为 300IU/ml。定量范围为 $300 \sim 2.5 \times 10^9$ IU/ml。标准曲线相关系数 $|r| \geq 0.980$ 。最低检出限为 30 IU/ml，阳性检出率 $\geq 95\%$ 。

3.精密度：重复检测企业精密度参考品 10^5 IU/ml 和 10^3 IU/ml 浓度 HBV 阳性样本 10 次，变异系数 $CV(n=10) \leq 5\%$ 。

4.不同基因型的覆盖：本试剂可检测 HBV 常见型别（A 型、B 型、C 型、D 型），最低检出限、定量限阳性样本检测符合要求。

5.分析特异性：

a.临床特异性：通过三家医院在临床使用中对研制的产品的主要性能指标与同类已上市产品罗氏诊断产品（上海）有限公司生产的 COBAS® AmpliPrep/COBAS® TaqMan® HBV Test,v2.0 进行了对比试验，与对比试剂进行相关性，线性回归统计，对检测结果进行交叉四格表分析。宝瑞源生物技术（北京）有限公司生产的乙型肝炎病毒核酸（DNA）定量检测试剂盒（荧光 PCR“一管法”）中的 HBV DNA 检测的临床血清样本阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%，血浆样本阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%。

b.交叉反应：本试剂盒与甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、人类疱疹病毒 6 型、甲

型流感病毒、痤疮丙酸杆菌、金黄色葡萄球菌和白色念珠菌的病毒在 10^5 pfu/ml 水平、细菌在 10^6 cfu/ml 水平无交叉反应。梅毒阳性患者血清对本试剂无交叉反应。

c.干扰物质：样本中常见干扰物质高浓度的胆红素(50μmol/L)、甘油三酯(2.0mmol/L)、血红蛋白(200g/L)、IgG (20g/L)、EDTA (3.0mg/ml)、普通干扰素 IFN α -2a 为 3000pg/ml、普通干扰素 IFN α -2b 为 3000pg/ml、普通干扰素 IFN α -1b 为 3000pg/ml、聚乙二醇干扰素 α -2a 为 20ng/ml、聚乙二醇干扰素 α -2b 为 500pg/ml、拉米夫定为 100ng/ml、阿德福韦酯为 100ng/ml、恩替卡韦为 10ng/ml、替比夫定为 5 g/ml，对试剂盒的检测结果没有影响。

【注意事项】

1.本产品仅用于体外诊断。

2.检验前请仔细阅读本说明书。

3.使用本产品时，应遵循临床基因扩增实验室的技术规范进行操作。临床基因扩增实验室应该分为以下三个区域、并且各个区域应具有以下表格中的必备物品，各区的仪器、耗材、试剂等独立专用。

PCR 准备区 (PCR 反应体系配制区)	样本处理区 (样本处理、加样区)	检测区 (PCR 扩增、荧光检测、结果分析区)
迷你离心机 旋涡混合器 冰箱(4℃；-20℃) 移液器一套 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套， 无菌吸头、离心管、PCR 反应管 紫外灯 专用工作服和办公用品	生物安全柜 台式高速离心机 旋涡混合器 冰箱(4℃；-20℃) 移液器一套 紫外灯 离心管架 消耗品：无粉乳胶手套， 无菌吸头、离心管 专用工作服和办公用品	荧光定量 PCR 仪 紫外灯 专用工作服 办公用品 无粉乳胶手套

4.操作人员应经过以下专业培训，具有合格的操作技能方能上岗。

a.本产品说明书要求的操作培训。

b.临床基因扩增实验室各个区域仪器设备的操作培训。

c.《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》法规的安全防护培训。

5.在生物安全柜内进行试剂和样本准备，实验过程中穿工作服，戴口罩和一次性手套。新采集的检测样本，离心后直接进样检测，然后封闭保存。禁止检测样本开盖保存。

6.在离心管中保存的样本，在检测前需混匀瞬时离心后再使用。

7.所有样本都需被视为潜在污染源，应在生物安全柜内小心处理，实验材料如果出现外溅，则需根据材料性质的不同分别处理。

8.样本制备区内的生物安全柜、操作台、移液器、离心机及其他设备都应使用 10%

次氯酸钠溶液消毒，然后用实验室三级水或 70%乙醇洗涤去除残留的次氯酸钠。

9.试剂使用前要完全解冻，应避免反复冻融。

10.吸取血清/血浆时注意勿带入红细胞。

11.所用无菌消耗品应一次性使用，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。对每次实验进行质量控制。移液器必须定期校准。

12.样本制备区所用过的吸头需打入盛有消毒剂的容器，并与废弃物一起灭菌后方可丢弃。

13.操作结束后必须定期对实验室采取有效的去污染措施，结合各种不同的方法可达到最佳效果。去污染措施包括但不限于下面几种：a)用 5%(v/v)次氯酸钠清洁表面；b)试验后长时间的紫外照射试验操作台面和其他表面；c)实验器具如需要应高压消毒。

14.核酸释放剂和样本需在 PCR 扩增管底进行混匀操作，勿粘到管壁周围。

15.只有经过卫生部临床检验中心验收合格的实验室才允许发临床报告。

【标识的解释】

标识	说明
	查阅使用说明
	体外诊断医疗器械

【参考文献】

- 1.《慢性乙肝防治指南》(中华医学会肝病学会、中华医学会感染病医学分会联合制定 2005 版)
- 2.Suzan D. Pas, Edwin Fries, Robert A. Development of a Quantitative Real-Time Detection Assay for Hepatitis B Virus DNA and Comparison with Two Commercial Assays. Journal of Clinical Microbiology, 2000, 38(8): 2897-2901
- 3.Aki Abe, Kazuaki Inoue, Takeshi Tanaka. Quantitation of Hepatitis B Virus Genomic DNA by Real-Time Detection PCR. Journal of Clinical Microbiology, 1999,37(9): 2899-2903
- 4.I. Zanella, A. Rossini, D. Domenighini. Quantitative Analysis of Hepatitis B Virus DNA by Real-Time Amplification. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2002, 21(1): 1435-4373
- 5.K. Brechtbuehla, S. A. Whalleyb, G. M. Dusheiko. A rapid real-time quantitative polymerase chain reaction for hepatitis B virus. Journal of Virological Methods. 2001, 93(1-2): 105-113

【基本信息】

注册人/生产企业名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

住所：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

联系方式：010-69390623 010-69390660

售后服务单位名称：宝瑞源生物技术（北京）有限公司

联系方式：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

网址：www.bioresource.com.cn

生产许可证编号：京食药监械生产许 20120027 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20163400771

【说明书核准及修改日期】

第 1 次核准及修改日期：2016 年 04 月 21 日

第 2 次核准及修改日期：2021 年 03 月 30 日