

乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒(荧光 PCR 法)

【包装规格】

24 人份/盒

【预期用途】

本产品用于体外定性检测乙型肝炎病毒(HBV)DNA 核酸阳性的血清或血浆样本中的乙型肝炎病毒 B、C 和 D 基因型。

我国北方城市以基因 C 型流行为主，由北方至南方，基因 B 型感染率逐渐增高，少数民族地区基因 D 型有较高的感染率。HBV 基因型与疾病进展和 IFNa 治疗效果有关。与 C 基因型感染者相比，B 基因型感染者较早出现 HBeAg 血清学转换，较少进展为慢性肝炎、肝硬化和原发性肝细胞癌（HCC）。HBeAg 阳性患者对 IFNa 治疗的应答率，B 基因型高于 C 基因型，A 基因型高于 D 基因型。本试剂盒对 HBV DNA 阳性血清或血浆中的 B 型、C 型和 D 型进行体外分型定性检测。帮助医疗专业人员了解已确诊为慢性乙型肝炎感染者的乙型肝炎病毒感染情况以及确定适当的治疗方法。本试剂盒检测结果仅供临床参考，不应作为治疗药物调整的唯一证据，临床医生应结合患者病情及其它实验室检测指标等因素对患者治疗进行综合判断。

【检验原理】

本产品采用微量核酸释放剂裂解、释放血清或血浆样本中的 HBV-DNA。选用人乙型肝炎病毒基因组中编码表面抗原 S 基因的编码区为扩增靶区域，设计特异性引物及各型特异性探针。利用 HBV B 型特异性引物及荧光探针、C 型特异性引物及荧光探针、D 型特异性引物及荧光探针，配以 PCR 反应液，采用荧光 PCR 技术对 HBV B 型、C 型、D 型的特异性 DNA 核酸片段进行检测。

本产品设计了 HBV-B/C 型检测体系以及 HBV-D 型检测体系，在 Taq 酶的作用下对靶区域进行扩增，同时利用 Taqman 荧光探针技术实时监测扩增产物的累积。同时本产品采用内标质控体系，用于监测反应体系可能存在的抑制因素。内标模板与靶基因无同源性，内标探针选择的是与靶基因探针没有冲突的另一检测通道。

【主要组成成分】

序号	产品组成	主要成分
1	核酸释放剂	蛋白酶 K，曲拉通 X-100

序号	产品组成	主要成分
2	促释放剂	盐酸
3	HBV 内标	质粒
4	HBV-B/C 反应液	HBV 本体系引物及探针、内标引物及探针、TaqDNA 聚合酶、UNG 酶、氯化镁、脱氧核糖核苷三磷酸
5	HBV-D 反应液	
6	HBV-B/C 阳性对照品	已灭活 HBV-B/C 亚型混合阳性样本
7	HBV-B/C 弱阳性对照品	已灭活 HBV-B/C 亚型混合阳性样本
8	HBV-D 阳性对照品	已灭活 HBV-D 亚型阳性样本
9	HBV-D 弱阳性对照品	已灭活 HBV-D 亚型阳性样本
10	HBV 阴性对照品	已灭活阴性样本

注 1：不同批次之间同一组分不可以相互替换。

注 2：试剂盒以外需要的设备及材料

荧光定量 PCR 仪、漩涡振荡器、生物安全柜、迷你离心机、移液器及灭菌的吸头（带过滤塞）、灭菌离心管、石蜡油（灭菌）、PCR 样品反应管和无粉乳胶手套、口罩。

注 3：内标模板与靶基因无同源性。

【储存条件及有效期】

-20±5℃ 避光保存，有效期 8 个月。

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。

生产日期和使用期限见包装标签。

【适用仪器】

ABI 7500、Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪。

【样本要求】

1.适用样本类型：血清或血浆样本。

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直接室温 1200rpm 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 或枸橼酸钠的无菌收集管, 立即轻轻颠倒混匀, 直接室温 1200rpm 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. 样本保存和运送:

经上述处理后的待测样本可在 2~8℃ 保存 72 小时, -20±5℃ 保存 3 个月, 长期保存请置于 -70℃ 以下; 避免反复冻融 (建议不超过 10 次); 样品运输请采用不易碎的容器 (如冰壶或泡沫箱) 加冰袋密封运输; 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。

【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 HBV-B/C 型阳性、弱阳对照品, HBV-D 型阳性、弱阳对照品, 阴性对照品及待测样本的数量, 准备相应量的 PCR 反应管备用;

1.3 根据 HBV-B/C 型阳性、弱阳对照品、阴性对照品、待测样本的数量, 按比例 (HBV-B/C 型 PCR 反应液 35 μL/人份+促释放剂 2 μL/人份) 取相应量的 HBV-B/C 型 PCR 反应液及促释放剂, 充分混匀成 PCR-B/C mix, 瞬时离心后备用 (为保证扩增效率, 建议 PCR- mix 现配现用);

1.4 根据 HBV-D 型阳性、弱阳对照品、阴性对照品、待测样本的数量, 按比例 (HBV-D 型 PCR 反应液 35 μL/人份+促释放剂 2 μL/人份) 取相应量的 HBV-D 型 PCR 反应液及促释放剂, 充分混匀成 PCR-D mix, 瞬时离心后备用 (为保证扩增效率, 建议 PCR- mix 现配现用);

1.5 根据 HBV-B/C 体系、HBV-D 体系的阳性、弱阳对照品、阴性对照品、待测样本的数量按比例 (核酸释放剂 5 μL/人份+内标 1 μL/人份) 取相应量的核酸释放剂及内标, 充分混匀成核酸释放剂 mix, 瞬时离心备用。

2. 样本处理 (在样本处理区进行)

2.1 取 6 μL 核酸释放剂 mix, 加入 PCR 反应管中;

2.2 分别取 HBV-B/C 和 HBV-D 型阳性、弱阳、阴性对照品及待测样本各 5 μL 加入对应的 PCR 反应管中,

并用移液器在管底吹打混匀 10 次;

2.3 各 PCR 反应管中分别加入 30 μL 无菌石蜡油, 盖好管盖;

2.4 将 PCR 反应管放置在 PCR 仪中进行反应, 反应温度及时间设定如下:

温度	时间
95℃	10 分钟
4℃	5 分钟

2.5 每管悬空加入 37 μL 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 HBV-B/C 型阳性、弱阳性、阴性对照品, HBV-D 型阳性、弱阳性、阴性对照品, 及未知样本, 并设置样品名称, 记录样本摆放顺序。

4. PCR 扩增程序设置

4.1 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪

1) 仪器操作请参照仪器说明书。

2) HBV-B 亚型选 FAM 通道, HBV-C 亚型选 VIC 通道, HBV-D 亚型选 FAM 通道, 内标为 CY5 通道。

3) 循环参数设置:

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	40
4	退火, 延伸, 及荧光采集	62℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

4.2 Stratagene Mx3000P 荧光定量 PCR 仪

1) 仪器操作请参照仪器说明书。

2) HBV-B 亚型选 FAM 通道, HBV-C 亚型选 HEX 通道, HBV-D 亚型选 FAM 通道, 内标为 CY5 通道。

3) 反应条件设置:

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	40
4	退火，延伸，及荧光采集	62℃	35 秒	
5	仪器冷却	25℃	10 秒	1

5. 结果分析条件的设定

反应结束后自动保存结果，对各亚型的曲线和相应内标的曲线进行分别分析。根据分析后图像调节 Baseline 的 Start 值、End 值以及 Threshold 值（用户可根据实际情况自行调整，Start 值可以设在 3~15、End 值可以设在 5~20，调整阴性质控品的扩增曲线低于阈值线或参照内标阈值线），点击 Analyze 进行分析，使用 Standard curve 窗口下的标准曲线图大道最佳，然后到 Plate 窗口下记录定量结果。

6. 质量控制

- 6.1 内标通道应出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。
- 6.2 HBV 阴性对照品的靶基因 FAM 和 HEX（VIC）通道无 Ct 值；内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。
- 6.3 HBV-B/C 型阳性对照品在 HBV-B/C 型 PCR 反应液的 FAM、HEX（VIC）通道均有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤30，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。
- 6.4 HBV-B/C 型弱阳性对照品在 HBV-B/C 型 PCR 反应液的 FAM、HEX（VIC）通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤36，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。
- 6.5 HBV-D 型阳性对照品在 HBV-D 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤30，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。
- 6.6 HBV-D 型弱阳性对照品在 HBV-D 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值应≤36，内标通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28。

以上条件必须在同一次实验中全部满足，否则本次实验结果无效。

【阳性判断值或者参考区间】

本试剂盒的阳性样本参考值为 Ct 值≤36；阴性样本无 Ct 值，HBV 内标检测为阳性且 Ct 值≤28；36< Ct 值<40 为灰区。

【检验结果的解释】

1.若内标通道没有出现 S 型扩增曲线，或内标通道虽出现 S 型扩增曲线，但 Ct 值>28，检测结果无效，应重新提取样本核酸进行检测。

2.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28，同时靶基因 FAM 或者 HEX（VIC）通道均无 S 型扩增曲线，则待检样本为 HBV B/C/D 型以外的其他基因型。

3.若内标通道出现 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤28，同时靶基因 FAM 或者 HEX(VIC)通道有 S 型扩增曲线，则有如下解释：

- 3.1 若待检样本在 HBV-B/C 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HBV -B 型阳性。
- 3.2 若待检样本在 HBV-B/C 型 PCR 反应液的 HEX(VIC)通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HBV -C 型阳性。
- 3.3 若待检样本在 HBV-D 型 PCR 反应液的 FAM 通道有 S 型扩增曲线，且 Ct 值≤36，检测结果报告为 HBV -D 型阳性。
- 3.4 若待检样本 Ct 值在 36~40 之间，并且扩增曲线正常，需重新提取样本核酸进行检测，若重复检测 Ct 值<40，B/C 体系 FAM 通道为 B 亚型，HEX（VIC）通道为 C 亚型；D 体系 FAM 通道为 D 亚型。
- 3.5 若待测样本检测结果某两个亚型反应体系均有扩增曲线，且 Ct 值均≤36，相应阴性对照均为阴性，排除交叉污染的可能性，则可判断该样本可能为混合感染。
- 3.6 若靶基因 Ct 值≤15 而又出现不规则曲线，应重新提取样本核酸稀释后进行检测，具体方法见本说明书的样本处理。

【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.本试剂盒仅用于乙型肝炎病毒核酸检测阳性患者的临床样本检测。
- 3.本试剂盒仅用于不同基因型的定性检测，不适用定量检测。
- 4.本试剂盒只能检测乙肝病毒基因 B、C、D 基因型，对其它基因型不能做进一步分析。因此，当本试剂盒检测结果为阴性时，并不能排除被检测者带有乙型肝炎病毒的其他基因位点。
- 5.当待测样本 HBV DNA 含量低于最低检测限 1×10^3 IU/mL 时可能会检测不到，表现为假阴性的结果；模板 DNA 的质量可能受样本来源、采集过程、运输条件、样本处理等因素影响，同时也受 DNA 提取方法、PCR 仪类型、操作环境以及当前分子生物学技术的局限性等的限制，可能导致出现假阳性和假阴性的检测结果。使用者需了解检测过程中可能存在的潜在风险。
- 6.本试剂盒以乙型肝炎病毒基因上的特定 DNA 片段为检测靶标，如试剂盒引物与探针结合区出现基因突变，

导致检测结果异常，将影响检测结果解释。

7.本产品不能区分基因重组型和混合型。

【产品性能指标】

1.最低检测限：1×10³ IU/mL，检测最低检出限参考品(L-B)、(L-C)及(L-D)结果应为阳性，且Ct值≤36。

2.精密度：将精密度参考品 B-E1、B-E2，C-E1、C-E2，D-E1、D-E2 各测定 8 次，Ct 值的检测结果 CV≤5%（n=8）。

3.分析特异性：

3.1 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、梅毒、人巨细胞病毒、E-B 病毒、疱疹类病毒均无交叉反应。

3.2 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(1.7mmol/L)、血红蛋白(200g/L)、EDTA (2.5mg/mL)、普通干扰素 IFN α (3000pg/mL)、拉米夫定 (100ng/mL)、阿德福韦酯 (100ng/mL)、恩替卡韦 (10ng/mL)、替比夫定 (5μg/mL) 对试剂盒的检测结果没有影响。

3.3 临床试验情况

通过在三家临床医院，使用本产品与同类已上市产品进行对比试验，考核试剂检测结果与参比试剂检测结果一致，阳性符合率为 100%，阴性符合率为 100%，总符合率为 100%，Kappa 为 1。

4.阳性参考品符合率：企业阳性参考品检测结果不得出现假阴性，符合率 8/8。

5.阴性参考品符合率：企业阴性参考品检测结果不得出现假阳性，符合率 8/8。

【注意事项】

1. 本产品仅用于体外诊断。

2. 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。

3. 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。

4. 请自备移液器，振荡器，迷你离心机，离心机，干式恒温仪或水浴锅，无菌吸头、离心管，PCR 反应管及无粉一次性乳胶手套（经常更换）。

5. 样本处理在生物安全柜内进行操作，防止污染环境和保护操作者。

6. 样本操作和处理需符合相关法规要求：卫生部《微生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。

7. 实验后的废弃物品，如吸头、扩增产物等需进行无害化处理后方可丢弃。

8. 所有检测样品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、口罩，并经常替换手套以避免样品间的交叉污染。

9. 实验完毕后使用 5%次氯酸或 75%乙醇处理操作台面和移液器、离心机、PCR 仪表面，然后紫外灯照射 20~30 分钟。

10. 不同批号试剂盒中各组分不可以互换，请在有效期内使用本试剂盒。不使用本试剂盒中的组分进行实验可能会导致错误的结果。

【标识的解释】

标识	说明
	体外诊断医疗器械
	查阅使用说明

【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

联系电话：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

联系电话：010-69390623 010-69390660

生产地址：北京市房山区窦店镇中心路 8 号

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 20173403226

【说明书核准及修改日期】