



乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 说明书

【产品名称】

通用名称：乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】

10人份/盒

【预期用途】

本试剂盒适用于检测患者血清中HBV-B、C和D型的分型检测。

乙型肝炎病毒基因型与乙肝发病机制、转归、抗病毒疗效均有密切关系。不同的基因型其临床感染特点和致病性也不完全相同。基因型B与慢性HBV携带及低年龄组原发性肝癌的进展有关，基因型C与肝脏疾病的活动性相关，且与母婴垂直传播有关；拉米夫定引起的HBV变异与HBV基因型密切相关，不同HBV基因型对拉米夫定的治疗反应不同。同时乙型肝炎病毒感染的临床预后不同可能与基因型有关。对乙型肝炎病毒分型的重要性在于：

- 1.根据感染的乙型肝炎病毒基因型对患者发生肝细胞癌（HCC）的危险性进行预测；
- 2.根据乙型肝炎病毒基因型预测患者的耐药风险；
- 3.为与乙型肝炎病毒相关的无症状病毒携带者提供临床用药的分子生物学依据。

因此，对患者血清中HBV基因型的测定，对于指导临床医生根据不同的基因型及临床表现制定不同的治疗方案和预后判断有着积极的作用。

【检验原理】

本品采用聚合酶链式反应（PCR）结合Taqman荧光探针技术，检测样品中B、C和D型乙型肝炎病毒，可检测B、C和D型单独感染和混合感染。采用双色探针，FAM波长检测B（或D）型乙型肝炎病毒，HEX波长检测C型乙型肝炎病毒。本品的优点在于一次实验同时检测B、C和D型乙型肝炎病毒，操作简单。试剂盒中使用dUTP和UNG酶，能够有效消除污染的扩增产物对检测结果的干扰。本品的缺点在于要求扩增仪具有特定的两个波长检测功能。

【主要组成成分】

组成成分	数量	规格	主要成分
DNA浓缩液	1管	1mL	聚乙二醇（PEG6000）、氯化钠
DNA提取液	1管	300μL	分子生物纯树脂（chelex 100）、三羟甲基氨基甲烷盐酸液（Tris HCl）、氢氧化钠（NaOH）、聚乙二醇辛基苯基醚（Triton-100）、裂解液（NP-40）、乙二胺四乙酸（EDTA）
B/C型PCR反应液	1管	440μL	引物、探针、脱氧核糖核苷三磷酸dN(TP)s、缓冲体系等
D型PCR反应液	1管	440μL	
Taq /UNG酶系	1管	20μL	Taq DNA聚合酶、尿嘧啶DNA糖基化酶（UNG酶）
乙型肝炎病毒基因分型阳性质控品	1管	100μL	经过灭活的B型乙型肝炎病毒阳性血清
乙型肝炎病毒基因分型阴性质控品	1管	100μL	经过灭活的乙型肝炎病毒阴性血清

说明：试剂盒中不同批号的组分不能互换使用。

阳性质控品和阴性质控品均为临床收集的样本并经过灭活处理，阳性质控品为基因测序结果为HBV B型的阳性血清，阴性质控品为HBV阴性血清。

【储存条件及有效期】

保存于-20±5℃，试剂盒有效期为6个月。生产日期和有效期见产品标签。

开封后室温5小时有效；反复冻融5次有效；运输7天内有效。

【适用仪器】

包括Agilent Mx3000p荧光PCR仪、ABI Prism7500荧光PCR仪。

【样本要求】

1.样本采集：抽取静脉血5mL，置于离心管中，贴上研究对象的姓名和编号标签。37℃孵育1小时，使之充分凝固。4000rpm离心4~10分钟，吸取透明的淡黄色液体约1.5mL，转入干净的1.5mL离心管，密封送样检测。血样中内源性干扰因子在高限值时（直接胆红素515μmol/L、胆固醇13mmol/L、胆汁酸30μmol/L、甘油三酯41mmol/L、葡萄糖55mmol/L）对检测无影响。

2.样本存放：血清室温放置不超过2小时，4℃保存不超过48小时，-20℃保存不超过半年，应避免反复冻融。

3.运送：标本运送在0℃左右条件下进行。

【检验方法】

1. 试剂配制

按样本数（样本数=待检血清样本数+质控品2个）n配制反应液：分别取出B/C型PCR反应液和D型PCR反应液，置于室温溶解后，将n×44μL B/C型PCR反应液和n×1μL Taq /UNG酶系加入一个离心管中并震荡混匀，瞬时离心后，45μL/管分装于PCR反应管中，作为B/C型PCR反应液管；将n×44μL D型PCR反应液和n×1μL Taq /UNG酶系加入一个离心管中并震荡混匀，瞬时离心后，45μL/管分装于PCR反应管中，作为D型PCR反应液管。各反应液管盖上管盖后转移到加样区，避光4℃保存备用。

2. 样本、质控品处理和加样

在0.5mL离心管中加入100μL DNA浓缩液及100μL待检血清样本，振荡混匀，12000rpm离心10分钟。吸弃上清（注意不要碰到底部沉淀），加入30μL DNA提取液至沉淀中（DNA提取液使用时须充分混匀），100℃保温10分钟，12000rpm离心5分钟，保留上清作为PCR反应模板。上清如不立即使用，必须置于-18℃以下保存，重新使用时需解冻后稍加离心。

加样：取样品处理上清液5μL分别加入B/C型PCR反应液管和D型PCR反应液管中，PCR反应液管瞬时离心，放入全自动荧光PCR仪。

注：HBV分型阳性质控品和HBV分型阴性质控品同步处理。

3. PCR扩增

按下列程序条件进行扩增：

Stage 1	37℃---2min	40cycles
Stage 2	94℃---2min	
Stage 3	94℃---15sec 60℃---45sec	

注：在Stage 3的60℃---45sec收集荧光，荧光素设定为FAM和HEX（无HEX可以设定为JOE）。

结果分析：反应结束后自动保存结果，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值可以在2~6、End值可设在10~15，调整阴性对照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Report界面察看结果。

4. 质量控制

质控品	质控要求
HBV分型阳性质控品	结果判定为HBV B型，且B/C型PCR反应液管FAM通道Ct≤35.1， HEX通道及D型PCR反应液管通道均Ct=40
HBV分型阴性质控品	结果判定为HBV B/C/D阴性，且B/C型PCR反应液管两通道及 D型PCR反应液管通道均Ct=40

注：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。

5. 试验结果的判定

反应结束后自动保存结果，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值可以在2~6、End值可设在10~15，调整阴性对照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Report界面察看结果，具体判断如下表：

B/C型PCR反应液		D型PCR反应液	结果判断
FAM通道	HEX通道	FAM通道	
Ct≤35.1	Ct=40	Ct=40	HBV B型
Ct=40	Ct≤35.1	Ct=40	HBV C型
Ct=40	Ct=40	Ct≤35.1	HBV D型
Ct≤35.1	Ct≤35.1	Ct=40	HBV B/C混合型
Ct≤35.1	Ct=40	Ct≤35.1	HBV B/D混合型
Ct=40	Ct≤35.1	Ct≤35.1	HBV C/D混合型
Ct≤35.1	Ct≤35.1	Ct≤35.1	HBV B/C/D混合型
Ct=40	Ct=40	Ct=40	HBV B/C/D阴性

注：35.1<Ct<40为检测灰区，建议复检，如复检结果仍为35.1<Ct<40参考Ct≤35.1判断。

【阳性判断值】

通过临床试验结果分析，利用ROC曲线法最终确定本试剂盒的参考值为Ct值等于35.1。

【检验结果的解释】

1. 混合型样本中的低含量型病毒用DNA测序分析等金标准方法难以检出。
2. HBV B、C、D型阴性仅表示样本中不含有B型、C型和D型乙型肝炎病毒，样本中可能含有其它型乙型肝炎病毒。

【检验方法的局限性】

试剂盒针对中国地区最为常见的B型、C型和D型乙型肝炎病毒设计，不能检测其它基因型；低于本试剂盒最小检出量浓度的样品无法检出。

【产品性能指标】

最低检出量：HBV-B型1×10³拷贝/mL、HBV-C型1×10³拷贝/mL、HBV-D型1×10³拷贝/mL；精密度：

批内差CV≤10% (n=10)，批间差CV≤10% (n=10)；分析特异性：血样中内源性干扰因子在高限值时（直接胆红素515μmol/L、胆固醇13mmol/L、胆汁酸30μmol/L、甘油三酯41mmol/L、葡萄糖55mmol/L）对检测无影响，检测临床上血清中常见的其他病原体（HAV、HCV、HEV、HIV、CMV），其结果均为阴性，检测其他型别的HBV样本（HBV A型、E型、F型、G型、H型），其结果均为阴性；临床比对实验：通过868例临床病例研究，本试剂盒检测结果与金标准DNA序列测定结果经kappa统计，两种测定方法的检测结果具有一致性，因K值在0.9以上，根据参考判断指标，其一致性强度为极强。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断。
2. 实验前请仔细阅读本说明书全文。
3. 实验人员应经过专业培训，实验过程严格分区进行；各区物品、工作服均为专用，不得交叉使用，避免污染，实验后请即清洁工作台。
4. 本产品使用前应在室温充分融化并混匀，但应避免反复冻融。
5. 标本处理应在生物安全柜中进行，以保护操作人员安全和防止对环境的污染。
6. 对每次实验进行质量控制。
7. 不同批号的试剂请勿混用，在有效期内使用试剂盒。
8. 加样时应使样品完全落入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
9. PCR反应使用的PCR反应管、离心管、吸头等应高压灭菌并一次性使用。
10. 扩增完毕取出反应管，密封在专用塑料袋内，按医疗废弃物处理。
11. 实验中用过的吸头请直接打入盛有10%次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物一同灭菌后丢弃。
12. 工作台及各种实验用物品经常用10%次氯酸钠、75%酒精和紫外灯进行消毒。

【参考文献】

1. Shuichi K, Stephen M, Roger H et al. Rapid and Sensitive Method for the Detection of Serum Hepatitis B Virus DNA Using the Polymerase Chain Reaction Technique. Journal of Clinical Microbiology, Sept. 1989, p. 1930-1933.
2. Abdel-Rahman N, Mohamed M, Nahed I et al. Hepatitis B virus (HBV) genotypes in Egyptian pediatric cancer patients with acute and chronic active HBV infection. Virology Journal 2007, 4:74.
3. Ying Liu, Munira Hussain, Stephen Wong et al. A Genotype-Independent Real-Time PCR Assay for Quantification of Hepatitis B Virus DNA. Journal of Clinical Microbiology, Feb. 2007, p. 553-558.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：泰普生物科学（中国）有限公司
住所：厦门市同安区西洲路2043号11层
联系方式：0592-3737666 咨询热线：400-7032032 网址：www.tibchina.com
售后服务单位：泰普生物科学（中国）有限公司
联系方式：0592-3737666 咨询热线：400-7032032 网址：www.tibchina.com
生产地址：厦门市同安区西洲路2041号101、201、301单元；2045号101、201、501单元
生产许可证编号：闽药监械生产许20110184号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准20163400888

【说明书核准及修改日期】 2016年05月03日批准；2017年10月27日修改；2018年03月15日修改；
2020年03月18日修改；2022年06月07日修改。