

【产品名称】

乙型肝炎病毒基因分型检测试剂盒（荧光 PCR 法）

【包装规格】

32 测试/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定性检测乙型肝炎病毒核酸阳性患者血清中的乙型肝炎病毒（B、C、D）基因型。

适用人群：应为已确诊为慢性乙型肝炎感染者。HBV 具有病毒复制产量高和突变率高的特征，多年的这种自发突变导致形成了 A~H 8 种 HBV 基因型。目前我国 HBV 以 B 型和 C 型最为常见（分别为 41% 和 53%），二者及二者的混合感染可达 98% 左右，B 型主要分布于南方，而 C 型则多见于北方、中原和华东地区，兼有少量 D 型。在香港、广州等南部地区也有少部分 D 型分布。C 基因型可分为 C1（Ce）、C2（Cs）、C3、C4 和 C5 五个亚型，B 基因型可分为 B1（Ba）、B2（Bj）、B3、B4 和 B5 五个亚型，D 基因型也可分为 D1~D5 五个亚型。乙肝病毒基因型与与疾病进程、感染后临床表现、预后和抗病毒治疗应答等密切相关。不同的基因型其临床感染特点和致病性不完全相同。B 基因型患者对普通干扰素和聚乙二醇干扰素为主的治疗均敏感，累积生存率要明显高于 C 型；和基因型 B 相比，HBV 基因型 C 的患者血清 HBeAg 出现迟、清除慢，核酸复制力强、更易进展为肝纤维化和肝癌，并且对干扰素治疗的反应性差，C 基因型患者仅对聚乙二醇干扰素治疗敏感。D 基因型容易在年轻的患者中发生原发性肝癌。HBV 基因分型的方法主要有：1）聚合酶链反应—限制性片断长度多态性分析法；2）型特异性引物 PCR 法；3）基因芯片法；4）全基因或 S 基因序列测定法等。本公司开发的试剂盒适用乙型肝炎治疗的辅助诊断，本试剂盒的检测结果仅供临床参考，不作为治疗药物调整的唯一依据，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。该产品未与具体药物联合进行临床试验，仅针对靶基因突变的检测性能进行了验证。

【检验原理】

本试剂盒分别选用乙型肝炎病毒 B 型、C 型和 D 型的保守基因片段设计特异性引物及特异性 TaqMan 探针（B 型、C 型和 D 型均用 FAM 荧光基团标记），该探针能与引物扩增区域中间的一段 DNA 模板发生特异性结合。在 PCR 延伸反应过程中，Taq 酶的外切酶活性将 5' 端荧光基团从探针上切割下来，使之游离于反应体系中，从而脱离了 3' 端荧光淬灭基团的屏蔽，即能接受光刺激而发出可供仪器检测的荧光，实现在全封闭反应体系中对患者样本中乙型肝炎病毒的 B、C 和 D 型进行分型检测。

本试剂盒设计一段人工合成的非竞争性的序列为内标模板，与乙型肝炎病毒的目标基因无干扰，再将这段序列输入 NCBI 网站进行 BLAST 比对分析，证实这段序列在 NCBI 的核酸库中是无法找到的，不会互相干扰，根据该内标模板设计引物探针，HEX 波长检测内标模板，从而实现在全封闭反应体系中对检测过程的监控，可有效监控假阴性的发生。

【主要组成成分】

组 成	主要成分	规 格
核酸提取液	含 NaCl、Tris-HCl、巯基乙醇、Chelex-100、内标模板	1.8mL×1
乙型肝炎病毒 B 型反应混合液	Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dTTP、dATP、dGTP、dCTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
乙型肝炎病毒 C 型反应混合液	Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dTTP、dATP、dGTP、dCTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
乙型肝炎病毒 D 型反应混合液	Tris-HCl、KCl、MgCl ₂ 、dTTP、dATP、dGTP、dCTP、引物、荧光探针	1.2mL×1
Taq DNA 酶	Taq DNA 酶及抗体	84μL×1
乙型肝炎病毒 B 型阳性对照品（C、D 型阴性对照）	主要成分为灭活后的病毒血清	100μL×1
乙型肝炎病毒 C 型阳性对照品（B、D 型阴性对照）	主要成分为灭活后的病毒血清	100μL×1
乙型肝炎病毒 D 型阳性对照品（B、C 型阴性对照）	主要成分为灭活后的病毒血清	100μL×1

注：本试剂盒采用煮沸法提取核酸，不同批号试剂盒中各组分不可以互换。

【储存条件及有效期】

-20℃±5℃ 保存，有效期 12 个月。

未使用完的试剂继续冷冻保存不影响其稳定性，试剂反复冻融三次后，-20℃±5℃ 下可保存 30 天；试剂开瓶后，在室温条件下放置时间不超过 8 小时；本产品应以冰盒或者冷藏车进行运输，模拟运输实验表明，运输条件不会影响产品的稳定性和有效期，但运输时间不应超过 7 天。生产日期及失效日期见包装标签。

【适用仪器】

扩增检测仪器为具有 FAM 和 HEX/VIC 荧光通道的 ABI7500 荧光 PCR 扩增仪和西安天隆公司的天隆 TL988-IV 四通道荧光定量 PCR 扩增仪。

【样本要求】

1. 标本：血清。
2. 采集：用一次性的针筒抽取病人静脉血 1mL，置于灭菌的一次性试管中室温自然凝固（不可用肝素抗凝），或 2000~4000rpm 离心 20 分钟，吸取分离出的血清 0.2mL 左右送检。
3. 存放：待测血清在 2~8℃ 保存不超过 72 小时；-20℃ 下保存，不超过 3 个月；-70℃ 下长期保存，但应避免反复冻融。
4. 运输：采用冰壶加冰或泡沫箱加冰密封进行运输。

【检验方法】

1. 样本处理【样本处理区】

取待测血清样本、乙型肝炎病毒 B 型、C 型和 D 型阳性对照品各 50μL（冻存血清使用前在室温融解并充分混匀）分别加入 50μL 核酸提取液（内含固体沉淀颗粒物，为使颗粒均匀分布，每次取样时请用吸头反复吸打），振荡混匀 15 秒，100℃ 水浴或干浴 10 分钟然后 12,000rpm 离心 10 分钟。取上清供 PCR 扩增用，或 -20℃ 储存备用。

2. 试剂配制【试剂准备区】

分别从试剂盒中取出乙型肝炎病毒 B 型反应混合液、乙型肝炎病毒 C 型反应混合液和乙型肝炎病毒 D 型反应混合液，在室温下融化并振荡混匀后，2000rpm 离心 10 秒。计算所需反应试剂测试数 $n[n=样本数+对照数(3)]$ ，分别配制如下三个反应体系：

体 系	组 分	乙型肝炎病毒 B 型反应混合液	Taq 酶	总体积
体系 1	体 积	35.2μL	0.8μL	36μL
体系 2	组 分	乙型肝炎病毒 C 型反应混合液	Taq 酶	总体积
	体 积	35.2μL	0.8μL	36μL
体系 3	组 分	乙型肝炎病毒 D 型反应混合液	Taq 酶	总体积
	体 积	35.2μL	0.8μL	36μL

按 n 测试计算上述各试剂的用量，加入一适当容积的离心管中，混匀。按 36μL 量分装到 PCR 薄壁管中，然后转移到样本处理区。

3. 加样【样本处理区】

单个反应总体积为 40μL，因此往上述分装有 36μL 反应液的 PCR 薄壁管中按顺序分别加入 4μL 的 B 型、C 型和 D 型阳性对照、样品处理上清液，盖紧反应管，转移至 PCR 检测区。

4. PCR 扩增及荧光检测【PCR 扩增区】

将各反应管按一定顺序放入荧光定量 PCR 仪上，按以下程序进行 PCR 扩增：

步 骤	循 环 数	温 度 (℃)	时 间
1	1	95	3min
		94	15sec
2	40	60	30sec（收集荧光）

检测荧光选择：检测样本（FAM），内标（HEX/VIC）。

【阳性判断值】

HBV B 型、C 型和 D 型阳性判断：FAM 通道检测 Ct 值小于或等于 38.0 时，则判断该样本为 HBV B 型、C 型或 D 型阳性。

【检验结果的解释】

阈值设定原则以阈值线刚好超过正常阳性对照品的最高点。B 型、C 型和 D 型阳性对照 FAM 通道的 Ct 值应小于 38，该试剂盒中 B 型阳性对照品可作为 C、D 型检测的阴性对照品，同样 C 型阳性对照品可作为 B、D 型检测的阴性对照品，D 型阳性对照品可作为 B、C 型检测的阴性对照品。阴性对照 FAM 通道的 Ct 值无数数据且内标 HEX/VIC 通道的 Ct 值 < 40；在阈值以上的荧光曲线应当是具有明显的 S 型曲线，否则该次实验视为无效，应检查仪器、试剂、扩增条件等方面的误差。具体判断如下表：

乙型肝炎病毒 B 型反应液		乙型肝炎病毒 C 型反应液		乙型肝炎病毒 D 型反应液		结果判断
FAM 通道	HEX/VIC 通道	FAM 通道	HEX/VIC 通道	FAM 通道	HEX/VIC 通道	
Ct≤38.0	Ct<40	Undet.	Ct<40	Undet.	Ct<40	HBV B 型
Undet.	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	Undet.	Ct<40	HBV C 型
Undet.	Ct<40	Undet.	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	HBV D 型
Ct≤38.0	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	Undet.	Ct<40	HBV B/C 混合型
Ct≤38.0	Ct<40	Undet.	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	HBV B/D 混合型
Undet.	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	HBV C/D 混合型
Ct≤38.0	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	Ct≤38.0	Ct<40	HBV B/C/D 混合型
Undet.	Ct<40	Undet.	Ct<40	Undet.	Ct<40	HBV B/C/D 阴性

注：Undet.表示无扩增
检测灰区判定：

- 1.检测样本 FAM 通道的 38.0<Ct<40 的样本建议重做，重做结果 Ct 值<40 者为阳性，否则为阴性。
- 2.如果检测样本测定的 FAM 通道的 Ct 值无数据，需要查看内标 HEX/VIC 通道的 Ct 值，如果内标 Ct 值<40 的标本为阴性标本，内标 Ct 值无数据则怀疑有假阴性的情况，应当重复试验。

【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.本试剂盒未包含全部乙型肝炎基因型。仅用于 HBV B 型、C 型和 D 型的检测，不适用其他已知基因型及未知基因型的检测。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。
- 4.样本中的被检物浓度低于检测限时，有可能造成假阴性的结果。
- 5.实验区域污染、气溶胶污染有可能造成假阳性结果。
- 6.不合理的样本来源、采集、转运、储存及处理过程等因素均有可能导致出现假阳性和假阴性的检测结果。
- 7.本试剂盒的适用于使用 ABI7500，天隆 TL988-IV 两种荧光定量检测系统对乙型肝炎病毒基因分型的检测，其他仪器尚无可靠实验数据，不建议使用。
- 8.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，如是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。
- 9.本试剂盒的结果判读无法有效的区分基因混合型和基因重组型。
- 10.由于本试剂盒不含 UNG 酶，请勿在 PCR 结束后开盖处理扩增产物，增加污染的风险。

【产品性能指标】

- 1.阳性符合率：取 HBV 基因分型阳性参考品 P1~P16 在对应的反应体系下均能够稳定的检测出阳性结果，符合率（+/-）为 6/6。
- 2.阴性符合率：阴性参考品 N1~N8 的样本在对应的反应体系下均能够稳定的检测出阴性结果且三种型别之间无交叉反应。
- 3.检测限：HBV B 型、C 型和 D 型的检测限均为 500copies/mL。
- 4.精密度：分别取 HBV B 型、C 型和 D 型的 2 例高、低浓度样本作为精密度样本 J 高，J 低，每例重复测试 10 次，检测 Ct 值的变异系数（CV，%）≤5%。
- 5.特异性：
 - ①交叉反应：检测临床上血清中常见的其他病原体（甲型肝炎病毒、丙型肝炎病毒和戊型肝炎病毒），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 型和 H 型），其结果均为阴性；
 - ②干扰物质：血清样本中干扰物在最高限值时（游离血红蛋白 500mg/mL、甘油三酯 18mM、胆红素 515μM、EDTA 抗凝剂 0.8mg/mL）对检测结果无影响；
 - ③药物干扰：血清样本中药物干扰物在最高限值时（α 干扰素 300U/mL、拉米夫定 4.5μg/mL、阿德福韦酯 75ng/mL、替比夫定 15μg/mL）对检测结果无影响。

【注意事项】

- 1.本试剂盒涉及的待测样本应视为具有传染性物质，操作和处理均需符合卫生部《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》相关要求。
- 2.有关实验室管理规范请严格按照《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。
- 3.本试剂盒仅用于体外检测。
- 4.本试剂盒的所有操作应严格按照说明书进行。
- 5.实验室严格分区操作：
 - 第一区：试剂准备区-准备扩增所需试剂；
 - 第二区：样本处理区-待检测样本和对照品的处理；
 - 第三区：PCR 扩增区-PCR 扩增检测。
- 6.各区物品均为专用，不得交换使用，避免污染，每次实验完后立即清洁工作台。
- 7.使用不含荧光物质的一次性手套、一次性专用离心管、自卸式移液枪和带滤芯吸头。
- 8.反应液分装时应尽量避免产生气泡，上机前注意检查各反应管是否盖紧，以免荧光物质泄露污染仪器。
- 9.加样时应使样品完全加入反应液中，不应有样品粘附于管壁上，加样后应尽快盖紧管盖。
- 10.扩增完毕请立即取出反应管，密闭在专用塑料袋中，放于指定地点，等待统一处理。
- 11.实验中用过的吸头请直接打入盛有 1%的次氯酸钠的废物缸内，并与其他废弃物品一同灭菌后丢弃。
- 12.工作台及各种实验用品应定期用 1%的次氯酸钠、75%酒精或紫外灯进行消毒。
- 13.PCR 反应混合液应避免光低温保存。
- 14.不同批号的试剂请勿混用，并请在有效期范围内使用。

【参考文献】

- 1.《体外诊断试剂说明书编写指导原则》
2. Truong BX, Seo Y, Yano Y, et al. Genotype and variations in core promoter and pre-core regions are related to progression of disease in HBV infected patients from Northern Vietnam[J] . Int J Mol Med, 2007, 19(2) : 293.
3. Real time quantitative PCR. Genome Res. 6:986-994.
4. Kinetic PCR analysis: real-time monitoring of DNA amplification reaction. Bio/Technology11:1026-1030.
5. Zhao JR, Bai YJ, et al. Detection of hepatitis B virus DNA by real-time PCR using TaqMan-MGB probe technology. World J Gastroenterol. 2005. 11(4):508-510.
6. Liu WC, Mizokami M, Buti M, et al. Simultaneous quantification and genotyping of hepatitis B virus for genotypes A to G by real-time PCR and two-step melting curve analysis. J Clin Microbiol, 2006, 44:4491-4497.

【基本信息】

注册人/生产企业名称：苏州天隆生物科技有限公司
住所：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋 501 室
联系方式：0512-62525631 传真：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
售后服务单位名称：苏州天隆生物科技有限公司
联系方式：0512-62525631 传真：0512-62956337 网址：www.medtl.cn
生产地址：苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 07 栋(NW-07)501 室、苏州工业园区金鸡湖大道 99 号苏州纳米城西北区 06 栋(NW-06)504 室
生产许可证编号：苏食药监械生产许 20140001 号

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】 国械注准 20163401514

【说明书核准及修改日期】 2021.05.06