

本品系由自动化核酸提取系统提取乙型肝炎病毒，采用核酸扩增（PCR）技术结合荧光杂交探针技术及竞争性内标技术，对人血清和血浆中乙型肝炎病毒核酸（DNA）的定量检测。可用于临床对乙型肝炎的辅助诊断和抗病毒药物的疗效观察。

在HBV荧光定量PCR检测体系中，导入竞争性内标法和磁珠法提取检测HBV病毒DNA。在体系中加入竞争性内标的优点在于在相同的引物条件下可直接排除假阴性的结果。

特 点

- 1 采用亚微米磁珠法进行乙肝病毒提取，能够在我公司研制的自动化核酸提取仪上进行，保证了同批次质控品和样本乙肝病毒拷贝数提取的一致性，对于根据质控品进行数量判断的荧光定量PCR系统，大大增加了检测的准确性。
- 1 本试剂盒是基于我公司生产的荧光定量PCR检测系统开发的。相对于我国目前开发的试剂盒均是在国外的仪器上开发的情况，我公司将向我国的医院用户提供仪器和试剂盒配套的系统化解决方案，而不是基于国外的仪器平台，提高了仪器和试剂盒的配合度，结果更准确，稳定性更佳。
- 1 由于采用了MGB探针技术，加大了荧光分辨率，探针的稳定性大大提高，使检测的分辨率提高。
- 1 在HBV荧光定量PCR检测体系中，导入竞争性内标法可直接排除假阴性的结果。
- 1 磁珠提取方法还可对传统提取方法不能处理的如抗凝血剂处理的血液样本、溶血样本进行DNA提取并进行PCR检测。加大了试剂盒的适用范围。
- 1 试剂采用dUTP/UDG去污染系统。

操作流程示意图



试剂组成及保存

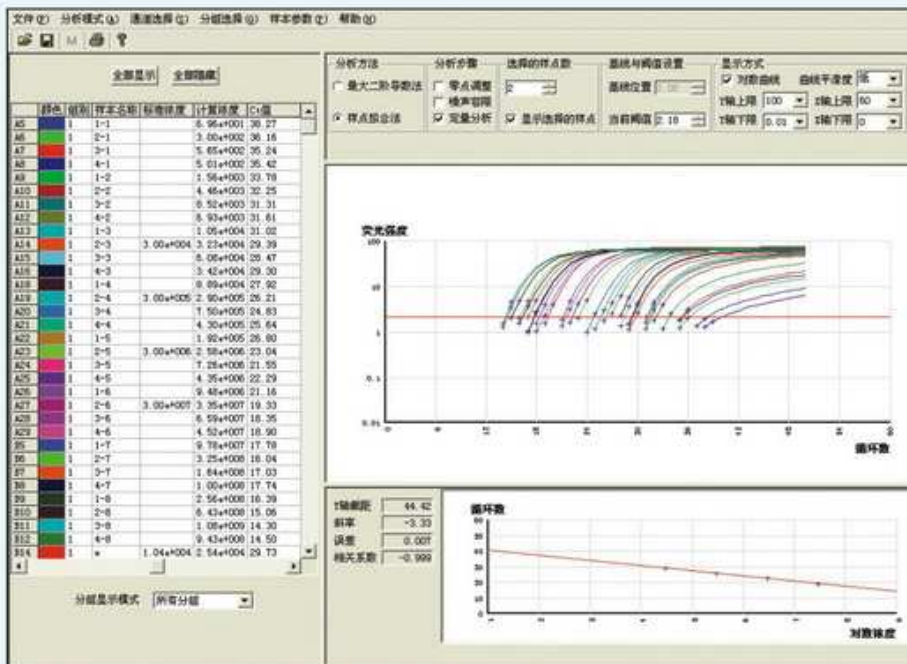
	试剂盒组成	体积
样本提取试剂	蛋白酶K	0.5ml
	裂解液	5ml
	结合液	12.5ml
	磁珠悬液	0.5ml
	洗液	10ml × 2
	洗脱液	5ml
	核酸扩增试剂	HBV PCR反应液
对照品	Taq酶	15ul
	UDG酶	5ul
	阴性对照	200ul
工作标准品	临界阳性对照	200ul
	强阳性对照	200ul
	工作标准品1: $(1-5) \times 10^7$ IU/ml	40ul
	工作标准品2: $(1-5) \times 10^6$ IU/ml	40ul
	工作标准品3: $(1-5) \times 10^4$ IU/ml	40ul
内标	工作标准品4: $(1-5) \times 10^4$ IU/ml	40ul
	内标	500ul

样本提取试剂中的蛋白酶K需2~8℃保存，其它组份室温保存。
核酸扩增试剂，对照品，工作标准品及内标须-20℃保存。

实验数据

一、灵敏度实验

将同一标准品直接分三次进行稀释，检测出最小拷贝数数据如下：
定量PCR结果图如下：



统计分析如下:

标本名称	浓度值(IU/ml)	平均浓度值(IU/ml)	Ct值	平均Ct值
2-1	3.00E+02	4.55E+02	36.16	35.61
3-1	5.65E+02		35.24	
4-1	5.01E+02		35.42	
2-2	4.46E+03	6.64E+03	32.25	31.72
3-2	8.52E+03		31.31	
4-2	6.93E+03		31.61	
2-3	3.23E+04	4.24E+04	29.39	29.05
3-3	6.08E+04		28.47	
4-3	3.42E+04		29.30	
2-4	2.90E+05	4.90E+05	26.21	25.56
3-4	7.50E+05		24.83	
4-4	4.30E+05		25.64	
2-5	2.58E+06	4.73E+06	23.04	22.29
3-5	7.26E+06		21.55	
4-5	4.35E+06		22.29	
2-6	3.35E+07	4.82E+07	19.33	18.86
3-6	6.59E+07		18.35	
4-6	4.52E+07		18.90	
2-7	3.25E+08	1.96E+08	16.04	16.94
3-7	1.64E+08		17.03	
4-7	1.00E+08		17.74	

上述表格数据表明, 直接稀释的最小检测拷贝数为4.55E+02IU/ml(平均值)时, 检测值稳定性较好, 并且线性范围达到了 $10^2 \sim 10^8$ IU/ml。

二、精密度实验

将10份含不同病原体量的临床标本或模拟标本(包括强阳性、临界阳性及低于临界值的标本)和试剂盒内3份对照品一起分送3个实验室, 在3个不同日期对每份标本作3次重复测定, 然后进行结果统计。

经统计学计算结果如下:

标本名称	-1	-2	-3	+/-1	+/-2	+/-3	+/-4	+1	+2	+3
对数平均值	-	-	-	3.68	4.58	4.29	4.36	6.37	5.80	5.91
对数标准差	-	-	-	0.18	0.07	0.09	0.12	0.35	0.29	0.22
Cv%	-	-	-	4.84	1.58	2.08	2.85	5.49	5.05	3.70

从三个实验室结果得出精密度结果, 平均标准差为0.19, 最大对数标准差为0.35, 平均CV值为3.66%, 最大CV值为5.49%。

本实验小结: 标准差和CV值较小, 表明精密度高。

三、中国药品生物制品检定所考评

L0~L5为HBV DNA 定量线性灵敏度参考品(L0~L5)分别为 $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^3$ IU/ml)。

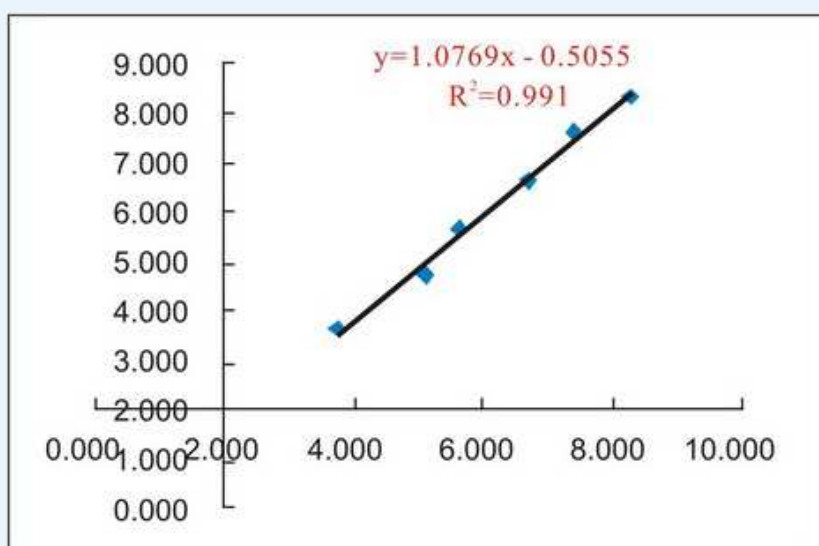
结果统计: 试验有效性判断: 试验有效, $r = -1.000 \leq 0.970$ 。线性灵敏度(L0~L5)检测结果:

①IU数 (IU/ml) :

线性灵敏度参考品7份	质量标准(IU/ml)	检测结果(IU/ml)
L5	$1.51 \times 10^3 \sim 1.23 \times 10^4$	5.58E+03
L4	$1.82 \times 10^4 \sim 1.48 \times 10^5$	1.31E+05
L3	$1.66 \times 10^5 \sim 1.32 \times 10^6$	4.09E+05
L2	$1.59 \times 10^6 \sim 1.26 \times 10^7$	4.76E+06
L1	$1.48 \times 10^7 \sim 1.18 \times 10^8$	2.53E+07
L0	$7.76 \times 10^7 \sim 6.17 \times 10^8$	1.90E+08

②r值的计算：以理论值与测定值的双对数作回归分析计算r值

	L5	L4	L3	L2	L1	L0
理论值	3.636	4.715	5.672	6.649	7.619	8.343
测定值	3.747	5.117	5.612	6.678	7.403	8.279



$r = \underline{1.00}$

四、三家省级以上三甲医院考评结果

医院名称	病例数	符合率(%)	相关系数	配对T检验
1#	397	97.98	$r=0.975(P=0.001)$	$t=0.337, v=396, P=0.736$ (双侧), $P>0.05$
2#	369	98.92	$r=0.988(P=0.001)$	$t=-1.735, v=368, P=0.084$ (双侧), $P>0.05$
3#	341	98.50	$r=0.993(P=0.001)$	$t=-0.553, v=340, P=0.581$ (双侧), $P>0.05$

1. 符合率结果表明本试剂符合率高，具有较强的临床适用性，符合预期考核结果。
2. 相关系数和配对T检验结果表明，本试剂与对比试剂定量检测浓度值无显著差异。
3. 综上所述考核试剂定量结果与对比试剂有很好的一致性及符合率。

Cat#	产品名称	规格	价格	备注
BSB01M1A	HBV荧光定量PCR检测试剂盒	48T	¥1,440.00	-15~-25℃保存
BSB01M1B	HBV荧光定量PCR检测试剂盒(含内标)	48T	¥1,920.00	-15~-25℃保存