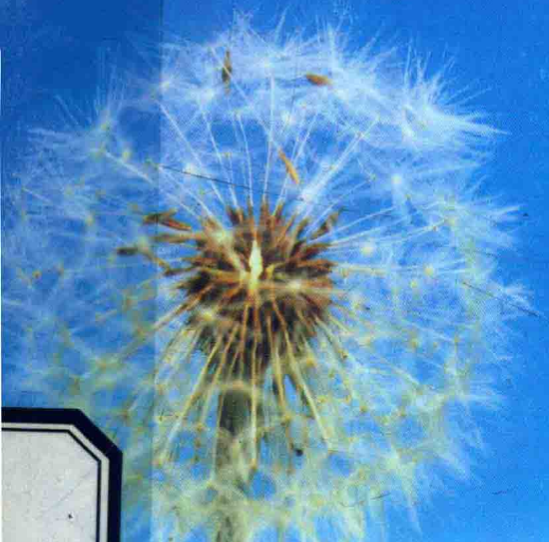


- 为您每月增加10万元收益
- 为您树立良好的社会形象
- 请选用维原瑞庚肝试剂盒

庚型肝炎病毒临床诊断



北京 维原瑞 科技发展有限公司



地址：北京丰台区东大街东里15号楼 100071
电话：(010) 63854321
传真：(010) 63858558
E-mail: Wang@ibmstone.pku.edu.cn

發展高科技
實現產業化

鄧小平題

鄧小平同志為我們高科技事業題字

北京维康瑞 独家新奉献
庚型肝炎试剂盒 (ELISA、PCR)

为贵单位月增加十万元收益

售后服务特点：为贵单位提供源源不断的患者接受化验，提高经济和社会效益

一、研制过程：

维康瑞庚型肝炎试剂盒开发研究的设想始于邓小平同志倡导“863计划”的当年，于1996年开发成功，历经十载，耗资千万元，参与此项研究的专家、教授及博士达几十人，所用实验工具多为国际精尖设备。庚肝试剂的研究成功不仅为863计划做出了贡献，而且表明我国科研工作者完全有能力在当今世界生物技术的最高领域占据一席之地。

二、产品特点：

1. 国际流行的操作方法。

① CI 指标设计的试剂盒，实用方便。

★每种试剂盒封面标签、试剂瓶标签、封条、说明书颜色均一致，不同试剂盒采用不同标识色，防止了一时疏忽混淆试剂造成的严重后果。

★封条上设计有温育时间和样品记录表，并有产品标识，可帮助辨别不同试验并明确试验过程。

★试剂盒内各试剂瓶位置固定，不同试剂瓶外观区别明显，便于使用。

★不同项目板条使用不同颜色标记。

★除提供 96 人份、48 人份标准包装外，还有 24 人份、12 人份小包装可供选择。

②操作时间短，标准法需 150 分钟，快速法仅需 45 分钟。

③预包被板条可任意拆成所需人份，如 1 人份。

④试剂以滴瓶形式包装，加入方便。

⑤标记物溶液和中和溶液均采用着色技术，防止了重加和漏加试剂造成的假阳性和假阴性。

⑥可用蒸馏水直接洗涤而结果的准确性不变。

⑦使用 TMB 做为底物，显示出的蓝色清晰易读。

2. 完美的技术，可靠的结果。

标准的预包被抗原技术，其灵敏度为 10pg/ml，特异性高（与十几种传染病的最大交叉反应为 0.15%），792 例临床符合率为 99.8%。

3. 运输及储存中的安全性和质量可靠性。

①试剂盒采用国际流行包装，海绵垫内衬，适于邮寄、火车托运及空运等各种运输形式，且不会因温度差异造成破损泄漏。

②高科技研制的试剂溶液极其稳定，可耐受冰冻、任意室温和 37 摄氏度条件长达一周而不变质，利于运输和储存。

三、经济效益和社会效益显著：

有资料表明庚型肝炎的发病率在肝炎中仅次于乙肝。是一种多发病、常见病。它可以单独感染人体，也可以与其它肝炎病毒同时感染，患有肝病的患者感染率较高，很多肝硬化患者与庚型肝炎病毒感染有关，潜在病源多。可疑庚肝患者除本单位接诊外主要由维康瑞公司提供。维康瑞公司出资在全国分地区宣传并组织庚肝可疑患者前往指定医院（即拥有维康瑞庚肝试剂盒的医院或防疫站）定期接受化验检查并可就地治疗，故医院

可获得可观的经济效益。

经济效益分析：

- 每人份成本约 70 元
- 每人化化验费 120 — 150 元
- 每人收益约 60 元
- 在维康瑞的组织下，每天接受患者约 60 人次
- 每日收益约 3600 元
- 每月收益约 10 万元
- 维康瑞为宣传您单位而投入的大量广告费，增加了贵单位的无形资产

庚肝试剂是现代生物高科技技术的结晶，世界上仅极少数国家拥有。在我国为维康瑞独家最新推出，且质量极高，堪称肝炎诊断领域里的跨世纪成就。能否及时把握高科技成果并将之快速应用于临床是衡量一家医院领导素质的标志之一，且是医院整体实力的重要组成部分，对庚肝早发现、早预防、早治疗、切断传染源，是医生的职责，是群众的心愿，因而是其社会效益的重要表现。

四、维康瑞的特殊承诺：

如对维康瑞产品不十分满意，我们保证可全额退换，请认准维康瑞品牌，谨防伪劣假冒。

维康瑞公司独一无二的服务特点是为你院提供源源不断的患者接受检验！



庚型肝炎病毒 (HGV) 检测试剂盒说明书

一、试剂的组成：

- | | | | |
|----------|-----|--------------|-----|
| 1. 抗原包被板 | 1 块 | 6、底物液 A | 1 瓶 |
| 2. 样品稀释液 | 1 瓶 | 7、底物液 B | 1 瓶 |
| 3. 阴性对照 | 1 支 | 8、终止液 | 1 瓶 |
| 4. 阳性对照 | 1 支 | 9、洗涤液 (20 ×) | 1 瓶 |
| 5. 酶结合物 | 1 瓶 | | |

二、操作程序：

1. 取出已包被 HGV 多肽抗原板条，每孔加样品稀释液 100 μ l (或 2 滴)，设空白、阳性对照、阴性对照各 2 孔，加待测血清和阳性、阴性对照各 10 μ l，空白孔不加。混匀后，置 37℃ 温箱 30 分钟。

2. 弃去反应板孔中样品，将洗涤液用蒸馏水稀释 20 倍后注满各孔，静置 60 秒后，弃去洗涤液，拍干板条，再重新注满各孔，如此反复洗六次，最后拍干，并吹去孔中气泡。

3. 每孔加酶结合物 100 μ l (或 2 滴)，置 37℃ 温箱 30 分钟。

4. 洗涤 (方法同 2)。

5. OPD：将底物液 A 液体全部倒入底物液 B 瓶中，充分混匀后，每孔加 100 μ l (包括空白)。37℃ 温箱反应 8 分钟左右。

TMB：A 液一滴，B 液一滴，室温避光反应 10 — 15 分钟。

6. 每孔加终止液 50 μ l (或一滴)。

7. 酶联比色仪测 490nm (OPD) 或 450nm (TMB) 波长光密度 (OD) 值。

三、结果计算和判断：

1. 阴性对照孔 OD 值 < 0.2 ，阳性对照 OD 值比阴性对照 OD 值大 0.5 方可认为测试有效。

2. 临界值 (Cut-off) $= 0.25 + \text{阴性对照平均 OD 值}$ 。

测试标本 OD 值 $<$ 临界值时为抗-HGV 阴性。

测试标本 OD 值 $>$ 临界值时为抗-HGV 阳性。

四、注意事项：

1. 温育温度和时间必须严格控制；

2. 试剂盒置 $2 - 8^{\circ}\text{C}$ 保存，有效期六个月；

3. OPD 底物液若不够用，可自行配制：

柠檬酸盐缓冲液 10ml，OPD 4 mg，加 30% H_2O_2 15 μl ，溶解后即可使用。

标准法检验步骤

完成后打 ○

1. 抗体与抗原反应， 37°C ，30 分钟；

第一次；



第二次;

第三次;

2. 洗涤液洗涤, 60 秒 $\times$ 6 次;

第四次;

第五次;

第六次;

3. 二抗与一抗反应, 100 μ l, 37 $^{\circ}$ C, 30 分钟

第一次;

第二次;

第三次;

4. 洗涤液洗涤, 60 秒 $\times$ 6 次;

第四次;

第五次;

第六次;

5. 显色, 加底物 $100 \mu\text{l}$, 37°C , 10 — 15 分钟;

6. 终止, 加终止液 $50 \mu\text{l}$;

7. 酶标仪测 450 nm 光密度 (OD) 值。



订货说明

1. 维康瑞公司庚型肝炎临床诊断试剂盒均为现货供应：

庚肝试剂价格

规格 (人份)	价格 (元)
96	6500.00
48	3600.00
24	2100.00

2. 订货：

① 订货方式：

电话订货：(010) 63854321, 63858558, 66850429 — 3086/
3149

传真订货：(010) 63858558, 63853222

E-mail 订货：wang@ibmstone.pku.edu.cn

② 订货要求：

首次订货客户须在订单或公函上签字并加盖单位公章，方可生效。公司凭此订单在 24 小时内发货。

③ 特别说明：

为了保证您所购的试剂盒在较短的时间内为更多的患者服务，请订货时即申报广告审批表，即贵单位在当地主管部门（如卫生厅、卫生局等）批一个广告证明（要求有广告批号）寄往维康瑞公司广告科，维康瑞出资帮您宣传组织患者前往化验。

广告内容（供您参考）：

庚型肝炎的传播途径及危害与乙肝相似，其发病率仅次于乙肝。其症状是：肝区不适，消化不良，四肢无力，情绪烦躁，

不明原因的肝硬化，黄疸，长期上腹不适，低热等，部分患者无症状。有慢性肝病的患者感染庚肝的机率比正常人高。过去由于没有庚肝检测试剂，致使庚肝长期不被发现，_____（贵单位）率先引进北京维康瑞公司推出的庚肝检测试剂，能及时准确地检验出您是否患有庚肝，为您早期治疗，防止传染及病情发展和转变提供依据。

贵单位的地址 _____

邮编 _____

联系电话 _____

乘车路线 _____

3. 汇款方式：

① 转帐汇款：开户银行：中国建设银行丰台支行

账 号：26197466

全 称：北京维康瑞科技发展有限责任公司

② 邮局汇款：北京市丰台区东大街东里 15 号楼 100071

4. 运输方式：

客户可自选火车托运，航空运送，特快专递等方式。北京地区免费送货，京外地区原则上款到发货。

5. 业务寻呼：北京 62045566 — 22151

62553399 — 8061

65949902 — 586628

64614488 — 5335

64635599 — 11869

64635599 — 11839



单位：北京维康瑞公司 地址：北京丰台区东大街东里 15 号楼 邮编：100071

电话：(010) 63854321 传真：(010) 63858558 E-mail: Wang@ibmstone.pku.edu.cn

庚型肝炎病毒介绍

众所周知,我国是全球病毒性肝炎高发区之一,而因血液途径造成的肝炎正因其日益增多而越来越引起重视。其实,这种途径造成的感染基本上是可以避免的。不能查出的原因除所用试剂质量及方法问题外,主要是因为致肝炎病毒除已知的甲、乙、丙、丁、戊五型外,还有其它的非甲-戊型肝炎病毒。丙型肝炎病毒(HCV)一直被认为是引起输血后非甲、非乙型肝炎的主要原因,但据可靠方法检测,非甲-戊型肝炎病毒造成的肝炎约占肝炎发病的20%左右,其发病率仅次于乙肝。寻找这些病毒一直是医学界的热点。最近,生物工作者刚刚发现其中的一种,目前暂定名为庚型肝炎病毒(HGV)。

一、发现过程:

三十年前,Deinhardt等人发现,一名34岁的外科医生G.B.因做手术时发生意外创伤而患急性不明原因肝炎,此人黄疸第三天的血清可静脉内感染狨猴和狨毛猴,导致它们全部发生肝炎,血清转氨酶升高,且传染性血清可在猴体内连续传代感染。当时称这种人源性血清致肝炎因子为GB因子,与之相关的肝炎为GB肝炎。在发现HCV和HEV后经特异性免疫学技术筛选证实,GB肝炎与已知五种肝炎均不相同,为非甲、非乙、非丙、非丁、非戊型肝炎(Hepatitis Non A,B,C,D,E. HNA-E)。

1995年4月,Abbott公司的Simons等报道,他们用代表性差异分析(Representational Difference Analysis, RDA)的差式聚合酶链反应法(Subtractive PCR)在用GB肝炎病人血清感染了狨毛猴后,从狨毛猴肝炎急性期血清中克隆出了两株新型的似



黄病毒样病毒。经种系进化分析,这两种病毒的RNA序列与人类、狨毛猴、黑猩猩、狨猴、酵母菌和大肠杆菌基因组DNA均无同源性。根据这两株病毒序列间的不同,分别称之为GBV-A和GBV-B。GBV-A、B间同源性约为27%,与其它黄病毒同源性约20%,其氨基酸与HCV公认螺旋翻译的氨基酸序列同源性较近,GBV-A为47.2%,GBV-B为57.0%。随后Simons等人用GBV-A和GBV-B的重组蛋白做为抗原,用ELISA技术检测HNA-E病人血清,发现一名西非地区患者相关抗体阳性。用RDA PCR扩增,得到一个黄病毒样基因产物,它在核苷酸水平上与GBV-A、HCV和GBV-B的同源性分别为59%、53.7%和47.9%,在氨基酸水平上与上述三种病毒的同源性分别为64.2%、57.3%和50.4%。经检索,新的黄病毒样基因序列与基因库Genbank和SWISS-Protein数据库中储存的所有发表的公认基因序列无任何同源性,与人、黑猩猩、酵母菌及大肠杆菌基因组DNA间也无同源性,因此将之称为GBV-C。种系进化分析表明,GBV-C与GBV-A间亲缘关系最近,两者核苷酸序列间异源性为35.8%,进化系数为0.5;与GBV-B和HCV间进化系数较远,与GBV-B间核苷酸序列的异源性为49.6%,进化系数为1.18。由此认为,GBV-A与GBV-C可能为黄病毒属中的同一亚型,而GBV-B则属另一亚型。虽然在感染人群血清中存在与这三种GBV发生免疫反应的相关抗体,但除GBV-C外,GBV-A/B病毒尚未在人群中找到。

1995年初,美国Genelab公司的Kim和美国疾病控制中心(CDC)的Bradley等人用一例输血后慢性肝炎病人的血浆感染灵长目动物,引起了急性肝炎,在此人血浆中发现了一个新的黄病毒样序列。他们在1995年8月28日--9月3日召开的第三届国际丙型肝炎及相关病毒会议上对此进行了正式报道,将此病毒



暂称为庚型肝炎病毒 (HGV) (因曾有人报告发现已型肝炎病毒)。它的多蛋白与 GBV-A/C 同源性较高 (43.8%), 与 GBV-B 的同源性则相差甚远 (28.4%)。RNA 依赖的 RNA 多聚酶 (RDRP) 和螺旋区序列的同源性则高得多, HGV 与 GBV-A 间约 60%, 与 GBV-B 和 HCV 间约 40-50%。现在认为, GBV-A 可能属于狨猴中潜伏或本身具有的一种肝炎病毒, 而 GBV-C 与 HGV 核苷酸和氨基酸的高同源性 (85-90% 以上) 则表明它们是同一种病毒的不同分离株, 且其遗传进化高度保守。HGV、GBV-A/B/C 和 HCV 均属于黄病毒科, 肝炎相关病毒属, 虽为不同病毒, 但在遗传进化上密切相关。1996 年初, Linnen 等人又报道从一例慢性肝炎病人的血浆中分离到了 HGV。

二、病原学:

GBV-A/B 是有包膜的单股正链 RNA 病毒, 直径小于 100nm, 可通过 $0.1 \mu m$ 的滤膜。GBV-A 基因组长约 9493 个核苷酸碱基, GBV-B 约 9143 个核苷酸碱基, 均有一个保守的三磷酸核苷 (NTP) 结合修饰物和一个连续的大的开放读码框架 (ORF), 可编码约 2860-2900 个氨基酸多蛋白前体。含有 NTP 结合修饰物的病毒蛋白可能是 RNA 螺旋的亚单位, 它参与病毒复制时双链复制形式的解旋和 RNA 基因组之间的重组。近 5' 端 1/3 为结构基因区, 近 3' 端 2/3 为高度保守的非结构基因区。根据 RNA 多聚酶 II 和绞链酶的特点, 它们与 HCV 很相近。

HGV、GBV-C 这两个单股正链 RNA 病毒基因组的全球鉴定率在氨基酸水平上为 95%, 其序列分析也清楚地表明它们是一种病毒的两个分离株。它们全长分别为 9392 和 9100 个核苷酸碱基左右, 编码一个连续的约 2900 个氨基酸的多蛋白前体。基因也分为 5' 端的结构区和 3' 端的非结构区, 在 ORF 前 5' 端有一

长约458个核苷酸左右的高度保守的非编码序列,后3'端是315个核苷酸的非编码序列。ORF编码一个2873个氨基酸的病毒多蛋白,其中包括一个编码螺旋酶的序列,两个编码蛋白酶的序列,和一个编码RDRP的序列。其余包括包膜E1和E2区,非结构(Non Structural) NS2、NS3、NS4和NS5区等,其中E1、NS2、NS3和NS5四个基因已得到了鉴定。由于与抗体反应的氨基酸序列是互补链ORF编码的119个氨基酸的一部分,所以负链的ORF可能是感染期间表达的。HGV多蛋白的氨基端与HCV的衣壳蛋白对应,但与HCV相比残基数目较少,说明HGV的衣壳蛋白可能缺失或缺损,且HGV和HCV的这些区域是一个衣壳蛋白祖先的截断的衍生物。HGV3'端非结构区基因与GBV-A/B/C和HCV的相同区域有较高的同源性,HGV、GBV-A、GBV-B的保守区覆盖了HCV多蛋白的整个非结构区。而HGV5'端结构基因与HCV和GBV-B同一区域的差异性较大。(请见图HGV在黄病毒家族中与肝炎相关的其它病毒保守区序列的对比)

E1

HGV	71 (34)	LLLLLVVEAGAILAPATHACRANGQYFLTNCAPEDIGFCLEGGCLVALGCTICTDQ	746
GBV-A	10	WLLVCFPLAGGVLFNSRHQCFNGDFVVLNCCSRDEVYFCFGDGLVAYGCTVCTQS	793
GBV-B	141	LFVVCLLSLACPCSGLRVTDPDINTILTNCQQRNQVYICSPSTCLHEPGCVICADE	660
HCV	175	IFLLALLSCLTVPASAEVRNASGVYHVTNDCSNSSIVFEANDLIMRTPGCVPCVRE	708
Consensus		UUUU.U.....USN.C...U.U.....U..GC..C...	

NS2 Zn protease

HGV	KMCARGAYLFDHM	20	LSFTLTTCRIIRDAARTLSCGQVMGLPVVARRGDEVILIGVFQDVNHLVPGFVPTAPV
GBV-A	VLKRKGVLLYEHA	20	VSITKEDCNIVRDSNRVLGCGQLVHGKPVVLRRGDEVILIGVNSRFDLPPGFVPTAPV
GBV-B	VFGENGVFYKHL	18	FPPEEGKARVYRNEGRRACGDTVDGLPVVLRGLDLVFNGLAMPDP---GWAITAPF
HCV	LGALTGTVVYNHL	20	VTESDMETKIIITWGNDTNACGDIIILGLPVSARRGREIILGPADSLV---GOGWRLLAPI
Consensus	G.UUU.H.		U.....UU.....CG..U.G.PV.AR.G..U.G.....GU...APU

HGV在黄病毒家族中与肝炎相关的其它病毒保守区序列的对比

据 K. Ohba 等人对 GBV-A/B、HCV 和其它黄病毒, 某些动、植物病毒间进化关系的研究, HCV 和这些病毒之间氨基酸序列的同源性为 20-30%。他们用非加权配对数据算术平均值法 (Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic mean, UPGMA) 和相邻加入法 (Neighbor-Joining, NJ) 建立了种系进化 phylogenetic 树, 用 NEIGHBOR 和 DRAWTREE 程序组织进化树结构以显示病毒间进化关系, 用 PHYLIP 法计算进化距离, 用 PROTDIST 程序估计氨基酸序列对间的基因距离。他们的结论显示, UPGMA 和 NJ、PHYLIP 法结果基本相同, 从人类和猴体内得到的 GBV-A/B 与 HCV 亲缘性最近; 这些病毒与感染动物的动物疫病毒一起形成一个群体, GBV 的进化位置处于 HCV 和动物疫病毒之间; 这些病毒与吸血的节肢动物传播的黄病毒又成一群。这样看来, 这些病毒可能是从一个病毒祖先按植物、昆虫、动物、猿猴、人这个方向进化, 也可能 HCV 和 GBV 是由植物、昆虫、动物病毒之间分子重组进化而来。

令人惊奇的是, HCV 基因型的基因多变性比感染不同宿主的牛病毒性腹泻病毒 (BVD) 和公猪霍乱病毒 (HOG) 还要大。这提示 GBV-A/B/C 可能也有巨大的基因差异性。在 Yoshida 等人的研究中, 从三个病人体内克隆出的 PCR 产物经分析均来自 GBV-C 序列, 但三者之间和与 Simons 等人报告的序列之间均有微小但明显的不同。这一可以说明产物并非来自污染, 二也证实了 GBV-C 基因组的差异性。

三、流行病学：

因为对人群中的流行情况研究有限，这方面的资料主要来源于对既往肝炎病例的回顾性调查。我国是世界上肝炎高发地区之一，肝炎患者总数居世界首位。根据美国国立卫生研究院 (NIH) Shik 等人的调查，HGV/GBV-C 呈全球性感染，感染主要经血或肠道外途径传播。在 48 例接受输血的手术病人中，有 1 例 (2%) 可检测到 HGV-RNA。由此看来，受血者、静脉注射毒品成瘾者、接触血源的医务工作者及长期与庚肝患者亲密接触的人为高危人群。现有资料表明，HGV 在美国供血员，特别是职业供血员中的流行情况比 HCV 严重。对美国供血员的调查显示，2% 的供血员抗 GBV 反应阳性。在我国则明显高于此比例，部分地区可高达 10%。

曾有研究显示，GBV 的抗体在西非 HNA-E 肝炎病人中很普遍 (48%)，但日本 HNA-E 病人抗体比率则较低 (约 5%)。在 Yoshida 等人对六个爆发性肝炎病人的研究中，三人 GBV-C RNA 阳性。虽然样本很小，但也表明 GBV-C 已侵入东方人群，且在爆发性或亚爆发性肝炎中起重要作用。这三个 GBV-C RNA 阳性的病人均有 GBV-C 的感染或接触史。一人十六年前接受过输血，一人的职业为护士 (但无已知的针刺事故史)，一人曾有急性自限性非甲、乙、丙型肝炎。所以他们的爆发性肝炎可能是 GBV-C 长期潜伏感染后急性恶化的结果。

Kuroki 等人对七个非 A-E 爆发性肝炎病人用 RT-PCR 检测 GBV-C 基因组的流行。此七人均无输血或急性肝炎史，且不属于高危人群，其中六人为亚急性形式并死于肝衰。HAV, HDV 的血清学试验和 HBV、HCV、HEV 的 PCR 均为阴性。所有病人都曾进行过血浆去除术。入院时无一人血清含 GBV-C，但一人输血后 GBV-C 阳性。