

受理号：CSZ1900206

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA) 测定试剂盒 (PCR-
荧光探针法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：北京热景生物技术股份有限公司

国家药品监督管理局

医疗器械技术审评中心

目 录

基本信息.....	3
一、申请人名称	3
二、申请人住所	3
三、生产地址	3
技术审评概述.....	4
一、产品概述	4
二、临床前研究概述	5
三、临床评价概述	12
四、产品受益风险判定	15
综合评价意见	18

基本信息

一、申请人名称

北京热景生物技术股份有限公司

二、申请人住所

北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢

三、生产地址

北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街9号9幢

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒由 A 盒（磁珠法核酸提取试剂）和 B 盒（扩增反应试剂）组成，主要组成成分见表 1。

表 1 试剂盒主要组成成分

A 盒：

组分	主要成分	规格/体积
裂解液	1%SDS; 25mM Tris-HCl; 10mM EDTA	10.0mL (1 瓶)
磁珠溶液	Fe ₃ O ₄ 磁性颗粒	1.0mL (1 管)
洗液 1	400mM 氯化钠; 30mM Tris-HCl	15.0mL (1 瓶)
洗液 2	400mM 氯化钠; 0.5M 乙酸钾; 30mM Tris-HCl	5.0mL (1 瓶)
洗液 3	200mM 氯化钠; 30mM Tris-HCl	30.0mL (1 瓶)
洗脱液	10 mM 氯化钠; 10mM Tris-HCl	2.5mL (1 瓶)

B 盒：

组分	主要成分	规格/体积
HBV-RNA 内标	含内标片段的假病毒溶液	50μL (1 管)
DNA 酶 I	DNA 酶 I, 甘油	100μL (1 管)
HBV-RNA 反应液 A	HBV-RNA 特异性引物及探针、内标引物及探针、dNTPs、10×RT-PCR Buffer	0.5mL (1 管)
HBV-RNA 反应液 B	2×逆转录缓冲液、逆转录酶、TaqDNA 聚合酶	1.25mL (1 管)
HBV-RNA 弱阳性质控品	含 HBV-RNA 目标片段的假病毒溶液	1.0mL (1 管)
HBV-RNA 强阳性质控品	含 HBV-RNA 目标片段的假病毒溶液	1.0mL (1 管)
阴性质控品 A	阴性血浆/血清 (已灭活)	1.0mL (1 管)
阴性质控品 B	含 HBV-DNA 目标片段的假病毒溶液	1.0mL (1 管)
HBV-RNA 阳性定量参考品 1	含 HBV-RNA 目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁴ copies/mL)	1.0mL (1 管)
HBV-RNA 阳性定量参考品 2	含 HBV-RNA 目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁵ copies/mL)	1.0mL (1 管)
HBV-RNA 阳性定量参考品 3	含 HBV-RNA 目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁶ copies/mL)	1.0mL (1 管)
HBV-RNA	含 HBV-RNA 目标片段的假病毒溶液	1.0mL (1 管)

阳性定量参考品 4	(1.0×10 ⁷ copies/mL)
-----------	---------------------------------

具体内容详见产品说明书。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定量测定人血清样本中的乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA)。

已有研究数据显示,外周血血清中 HBV-RNA 可反映肝内 HBV 病毒的转录活性,在部分血清中 HBV DNA 低于检测下限的样本中,HBV-RNA 仍可以被检测到。同时,在 NAs 治疗中,血清 HBV-RNA 可辅助作为 HBeAg 转阴的预测的指标之一,血清 HBV-RNA 结果为阴性,需要结合其他指标共同用于指导 NAs 的治疗。该检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标,必须结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。本试剂盒不得用于 HBV 的血液筛查。

(三) 产品包装规格

48 人份/盒。

(四) 产品检验原理

本试剂盒 (PCR-荧光探针法) 采用磁珠法提取血清中的 HBV-RNA。特异性地检测 HBV-RNA 的保守区域。检测试剂内含有一条反转录引物、一对特异性扩增引物以及一条荧光探针,与 RT-PCR 反应缓冲液, Taq 酶, 逆转录酶等共同配制成 RT-PCR 反应液,在实时荧光定量 PCR 仪上进行一步法 RT-PCR 扩增,实现对血清样本中 HBV-RNA 的检测。

二、临床前研究概述

(一) 主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品的主要原材料包括：引物、探针、假病毒、RT-PCR 反应体系（包括 10×RT-PCR Buffer（含 dNTPs）、逆转录酶和 TaqDNA 聚合酶混合液）、磁珠法核酸提取试剂等，这些原材料均是通过外购方式获得。其中，引物和探针均为申请人自行设计，由专业的合成公司合成和纯化后获得。

申请人从有资质的供应商中，通过功能性试验，筛选出最佳原材料和供应商。制定了各主要原材料质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品设置情况

该产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品、检出限参考品、准确度参考品、样本线性参考品、核酸提取功能参考品，参考品采用临床样本制备而成。组成如下：

阳性参考品共 10 份，分别命名为阳性参考品 P1~P10，来源于 HBV-RNA 阳性样本，涵盖 B 型、C 型和 D 型。

阴性参考品共 10 份，分别命名为阴性参考品 N1~N10，涵盖正常人样本、巨细胞病毒、EB 病毒、人类免疫缺陷病毒 1 型、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒和梅毒样本。

精密度参考品共 2 份，分别命名为精密度参考品 J1~J2，

采用 HBV-RNA 阳性样本梯度稀释而成。

检出限参考品 1 份,命名为检出限参考品 S1,采用 HBV-RNA 阳性样本稀释而成,浓度为 300copies/mL。

准确度参考品共 5 份,分别命名为准确度参考品 Y1~Y5,采用 HBV-RNA 阳性样本梯度稀释而成,浓度分别为 2.0×10^7 copies/mL、 2.0×10^6 copies/mL、 2.0×10^5 copies/mL、 2.0×10^4 copies/mL、 2.0×10^3 copies/mL。

样本线性参考品 1 份,命名为样本线性参考品 L,采用 HBV-RNA 阳性样本稀释而成。

核酸提取功能参考品共 12 份,分别命名为核酸提取功能参考品 T1~T12,其中 T1~T8 采用含内源性干扰物质的 HBV-RNA 阳性样本稀释而成,T1、T5、T9 含血红蛋白,T2、T6、T10 含甘油三脂,T3、T7、T11 含总 IgG,T4、T8、T12 含总胆红素,T9~T12 为阴性血清样本。

以上临床样本采用数字 PCR 法和实时荧光 PCR 法进行确认。各企业参考品用于产品准确性、特异性、检出限、精密度、线性、核酸提取功能等的检测。

本试剂盒设置了阳性质控品和阴性质控品,用于检测过程中试剂盒和仪器的质量控制。此外,每个样本均检测 1 个内标,用于评估核酸提取和 PCR 扩增的质量和结果的判读。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对试剂盒反应体系的研究包括对 HBV-RNA 特异性引物/探针浓度的确定、内标引物/探针浓度的确定、反应液的选择、反应体积的确定、核酸提取试剂的确定、DNA 酶 I 的用量确定等；对反应条件的研究包括 PCR 退火温度、扩增循环数、扩增反应时间，DNA 酶 I 的作用温度和时间的筛选和优化；对样本用量、内标用量、核酸提取液体积等进行了研究。

申请人通过功能性实验，确定了最佳的反应体系。并根据试剂盒中试剂及组件的主要生产工艺的研究结果，确定了最佳的生产工艺。

(三) 分析性能评估

该产品分析性能评估内容包括核酸提取功能、检出限、线性范围、准确度、精密度、分析特异性（交叉反应、干扰物质）、HBV DNA 干扰浓度等。申请人提交了有效运行的质量管理体系下生产的三批产品在 3 种适用机型（ABI Prism7500、LightCycler480、杭州博日 9600plus）上的性能评估资料。

在核酸提取功能评估中，申请人使用含有 28mg/dL 总胆红素、22g/dL 血红蛋白、3000mg/dL 甘油三酯、40g/L 总 IgG 的 HBV-RNA 阴性血清样本稀释已知浓度的 HBV-RNA 强阳性样本，制备成高、低浓度样本进行研究，结果表明以上干扰物质对核酸提取性能无影响。

在检出限的性能评估中，申请人对 HBV-RNA 临床血清样本（B 型、C 型、D 型）和 HBV-RNA 假病毒样本（A 型、E 型、F 型、G 型）进行梯度稀释，采用三批次试剂对系列浓度样本分别进行 20 次重复检测，以 $\geq 95\%$ 阳性检出率的最低稀释浓度作为检出限，最终确定该产品检出限为 300copies/mL。采用三批试剂对 HBV-RNA 临床血清样本（B 型、C 型、D 型）和 HBV-RNA 假病毒样本（A 型、E 型、F 型、G 型）进行检出限的重复性检测验证，符合检出限的性能要求。

在线性范围的性能评估中，申请人采用不同基因型的样本，分别制备 9 个浓度的样本进行线性范围研究，产品在 $1.0 \times 10^3 \text{ copies/mL} \sim 1.0 \times 10^8 \text{ copies/mL}$ 范围浓度呈线性相关，线性相关系数 $r > 0.9800$ ，符合线性范围的性能要求。

在准确度的性能评估中，申请人采用 HBV-RNA 阴性样本对阳性样本进行系列稀释，分别制备成 $2.0 \times 10^7 \text{ copies/mL}$ 、 $2.0 \times 10^6 \text{ copies/mL}$ 、 $2.0 \times 10^5 \text{ copies/mL}$ 、 $2.0 \times 10^4 \text{ copies/mL}$ 、 $2.0 \times 10^3 \text{ copies/mL}$ 共 5 个梯度样本进行准确度研究，结果表明检测浓度的对数值与理论浓度的对数值的绝对偏差不超过 ± 0.5 个对数数量级，符合准确度的性能要求。

在精密度的性能评估中，申请人对高、中 2 个浓度的 HBV-RNA 精密度样本进行检测，分别对批内、批间检测结果进行

分析,结果表明精密度样本的变异系数均不高于 5%,符合精密度的性能要求。

分析特异性研究包含交叉反应和干扰研究。交叉反应的性能评估中,申请人对人巨细胞病毒、EB 病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、梅毒、人类疱疹病毒 6 型、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、丙酸痤疮杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌样本进行交叉反应评价。结果显示,上述样本与本产品均不产生交叉反应。

干扰研究实验中,申请人采用在中低浓度的 HBV-RNA 样本中加入干扰物质的方法进行验证,拉米夫定($1.3\mu\text{g/mL}$)、阿德福韦酯(21.24ng/mL)、恩替卡韦($3.46\mu\text{g/mL}$)、替比夫定($3.69\mu\text{g/mL}$)、普通 IFN α (2020pg/mL)、聚乙二醇干扰素 α ($10.88\mu\text{g/L}$)、总胆红素($\leq 28\text{mg/dL}$)、甘油三酯($\leq 3000\text{mg/dL}$)、血红蛋白($\leq 22\text{g/dL}$)、总 IgG($\leq 40\text{g/L}$)及不高于 $2\times 10^7\text{ IU/mL}$ 的 HBV DNA 对本产品检测结果均不产生干扰。

(四) 阳性判断值或参考区间研究

本产品的阳性判断值研究,采用乙肝感染者的血清样本(B 型、C 型、D 型)及不同人的阴性血清样本共 249 例,使用本试剂盒进行阳性判断值研究,对检测靶标 Ct 值进行 ROC 分析,确定其阳性判断值为靶标 $\text{Ct} \leq 26$ 。通过对 HBV

DNA 阳性/阴性、HBsAg 阳性/阴性及 HBeAg 阳性/阴性样本的靶标进行 Ct 值分析，HBV DNA 阳性/阴性、HBsAg 阳性/阴性及 HBeAg 阳性/阴性对靶标阳性判断值的判定无影响。

本产品预测 HBeAg 转阴的阳性判断值研究，采用 79 例慢性 HBV 感染者（B 型、C 型、D 型）队列血清样本（0 周、48 周、5 年），使用本试剂盒进行检测，对检测结果分别计算 B、C、D 型的 ROC 曲线和最佳预测 cutoff 值，结果显示均不具有显著差异；将 B 型、C 型、D 型样本合并共同用于确定预测治疗 5 年后 e 抗原转阴的最佳 cutoff 值为 708copies/mL。此时的 PPV 为 81.8%，NPV 为 87.0%。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的实时稳定性、开瓶及冻融次数限度稳定性、运输稳定性进行了研究，同时，对样本的稳定性也进行了研究，确定了在各种条件下本产品及其样本的有效保存时间。

实时稳定性：将三批次试剂的 A 盒置于 $10\sim 30^{\circ}\text{C}$ ，B 盒置于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 的条件下保存，连续 7 个月对试剂盒的外观、阴阳性符合率、检出限、线性、准确度、精密度进行考察，各项性能指标均符合要求，确定产品在规定的储存条件下，可稳定保存 6 个月。

此外，申请人对产品的开瓶及冻融次数限度稳定性、运输稳定性和样本稳定性分别进行了研究。结果显示，产品的

性能均满足产品说明书声称的要求。

一、临床评价概述

申请人在首都医科大学附属北京佑安医院、兰州大学第二医院、沈阳市第六人民医院共 3 家机构完成了临床试验，对考核试剂检测人血清中 HBV-RNA 的临床准确性和临床有效性进行验证。

(一) 临床准确性验证

采用考核试剂与参比方法对临床样本进行比较研究试验的方法验证本产品的临床准确性。入组样本为慢性 HBV 感染者、其他肝脏疾病干扰样本以及非肝脏疾病的正常人血清样本，共计 1033 例。参比方法选择 ABI QuantStudio 3 D 芯片数字 PCR 系统。

临床准确性研究在 3 家临床单位共检测了 1033 例血清样本，实际纳入检测 1033 例，包括慢性 HBV 感染者样本 709 例（68.64%），其他肝脏疾病干扰样本 78 例（7.55%），非肝脏疾病的正常人样本 246 例（23.81%）；675 例有分型结果的样本中，B 基因型 160 例、C 基因型 464 例、D 基因型 51 例。

对 1033 例入组血清样本进行考核试剂和参比方法符合率分析，阳性符合率 99.26%（95%CI：98.11% - 99.80%）、阴性符合率 98.99%（95%CI：97.65% - 99.67%）、总体符合率 99.13%（95%CI：98.35% - 99.60%）；Kappa（K）

=0.983，考核试剂和参比方法具有较好的一致性。

相关性分析显示考核试剂和参比方法的线性相关系数 $r=0.9864$ ，回归分析得出的线性回归方程为 $y=0.9854x+0.1123$ ，其中截距 a 的 95% 的置信区间为 $[0.0255, 0.1992]$ ，斜率 b 的 95% 的置信区间为 $[0.9693, 1.0015]$ 。

对 675 例有基因分型数据的样本检测结果进行分析。B 基因型血清样本，考核试剂与参比方法定量检测结果的相关系数 $r=0.9873$ ，线性回归方程为 $y = 0.9973x + 0.0083$ ，截距 a 的 95% 置信区间为 $[-0.1876, 0.2042]$ ，斜率 b 的 95% 置信区间为 $[0.9625, 1.0321]$ ；C 基因型血清样本，考核试剂与参比方法定量检测结果的相关系数 $r=0.9853$ ，线性回归方程为 $y = 0.9876x + 0.1229$ ，截距 a 的 95% 置信区间为 $[0.0161, 0.2296]$ ，斜率 b 的 95% 置信区间为 $[0.9672, 1.0080]$ ；D 基因型血清样本，考核试剂与参比方法定量检测结果的相关系数 $r=0.9918$ ，线性回归方程为 $y = 1.0241x - 0.1546$ ，截距 a 的 95% 置信区间为 $[-0.4375, 0.1290]$ ，斜率 b 的 95% 置信区间为 $[0.9748, 1.0732]$ 。考核试剂与参比方法的定量检测结果 ($\lg\text{copies/mL}$) 之差在 ± 0.5 范围内。

综上所述，申请人考核试剂与参比方法检测结果一致。

(二) 临床有效性研究

本研究中分别对考核试剂定量检测血清 HBV-RNA 用于预

测 NAs 治疗患者 HBeAg 转阴、HBV DNA 低浓度的 CHB 患者中 HBV-RNA 的检出率进行临床有效性研究。

1. 考核试剂定量检测血清 HBV-RNA 用于预测 NAs 抗病毒治疗患者 HBeAg 转阴研究

采用考核试剂对来源于回顾性队列样本的 78 个患者(接受 NAs 抗病毒治疗的 HBeAg 阳性慢性 HBV 感染者)的共 624 例血清样本进行 HBV-RNA 定量检测,每个患者采集 8 个标本,分别对应治疗前和治疗中的 8 个不同检测点:即 NAs 抗病毒治疗第 0 周、24 周、48 周、1.5 年、2 年、3 年、4 年、5 年。

优选治疗第 48 周血清样本中的 HBV DNA、HBV-RNA 定量值用于预测治疗五年后(一个治疗周期)HBeAg 转阴的受试者工作特征曲线(ROC)分析和这些定量值对 HBeAg 转阴的预测值分析。

分析结果显示, NAs 药物治疗的 78 例 HBeAg 阳性患者中,治疗 48 周 HBV DNA 定量和 HBV-RNA 定量预测 NAs 药物治疗五年后 HBeAg 转阴的曲线下面积(AUC)依次为 0.736 和 0.874。

HBV DNA 以 156.0 IU/mL 为阈值独立预测治疗 5 年 HBeAg 转阴的阳性预测值为 60.9%, 阴性预测值为 84.4%; HBV-RNA 以 708 copies/mL 为阈值独立预测治疗 5 年 HBeAg 转阴的阳性预测值为 80.6%, 阴性预测值为 83.3%。HBV-RNA 在治疗 48 周后预测五年 HBeAg 转阴的预测价值优于血清 HBV DNA 的预

测价值。

2. HBV DNA 低浓度 HBV 感染者中 HBV-RNA 检出率研究

本次临床试验共包含 374 例 HBV DNA 低浓度 (< 500 IU/mL) 或未检出样本, 其中 HBV DNA 阴性 227 例。在 HBV DNA 阴性样本中, HBV-RNA 检出阳性 145 例, 阳性检出率为 63.88% ($145/227$); 在 374 例 HBV DNA < 500 IU/mL 的慢性 HBV 感染者样本中, HBV DNA 检出阳性 147 例, 阳性检出率 39.30% ($147/374$), HBV-RNA 检出阳性 249 例, 阳性检出率 66.58% ($249/374$), $\chi^2=54.26$, $P < 0.05$, 具有显著差异。可见在 HBV DNA 低浓度或未检出的慢性 HBV 感染者中, HBV-RNA 具有较高的检出率。

综上所述, 临床试验结果显示本产品的临床性能满足技术审评要求。

四、产品受益风险判定

(一) 受益评估

本产品可用于对乙型肝炎病毒感染的辅助诊断, 也可以对 NAs 的治疗效果作出预测。我国乙型肝炎患者比较多, NAs 治疗可以提高乙型肝炎患者的治愈率, 单独检测 HBV DNA 可能存在漏检风险, 研究表明, 通过对 HBV DNA 已经检测不到的患者进行 HBV-RNA 的检测, 可以辅助对患者病情进行监测。

(二) 风险评估

该试剂盒已知和可预见的安全风险主要有以下几个方面：

1. 与预期用途有关的安全风险，例如本产品的检测结果非患者病情评价的唯一指标，未结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。

2. 与生产有关的安全风险，例如使用未经过验证或检验不合格的原材料。

3. 与运输与储存有关的安全风险，例如试剂的运输和储存超出规定条件。

4. 与使用有关的安全风险，例如使用仪器和试剂时没有按照说明书要求进行操作。

5. 生物危险，例如直接丢弃使用后或失效的产品或产品使用过程中产生的废弃物未按照医疗废弃物统一销毁处理。

通过对乙型肝炎病毒 RNA（HBV-RNA）测定试剂盒（PCR-荧光探针法）从生产原材料、配制、检测、包装、运输、储存、使用方法及安全注意事项、保存和用后处理等全过程危害判定、风险估计、预防化解，从产品技术要求和使用说明书及企业规章制度对产品质量的全过程控制和风险防范措施，已将产品的安全风险系数降到了验收准则规定的可接受范围内，同时采取降低风险的措施后没有引入新的风险。在目前认知水平上，认为该产品上市带来的受益大于风险。尽管目前认为该试剂盒的受益大于风险，但是为保证用械安全，基于对主要剩余风险的防控，已在该试剂盒说明书中提示以下

信息：

1. 预期用途：

本试剂盒用于体外定量测定人血清样本中的乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA)。

已有研究数据显示，外周血血清中 HBV-RNA 可反映肝内 HBV 病毒的转录活性，在部分血清中 HBV DNA 低于检测下限的样本中，HBV-RNA 仍可以被检测到。同时，在 NAs 治疗中，血清 HBV-RNA 可辅助作为 HBeAg 转阴的预测的指标之一，血清 HBV-RNA 结果为阴性，需要结合其他指标共同用于指导 NAs 的治疗。该检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标，必须结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。本试剂盒不得用于 HBV 的血液筛查。

2. 警示及注意事项：

该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检验方法的局限性及注意事项。

综合评价意见

本申报项目为境内第三类医疗器械产品注册。申请人的注册申报材料符合现行要求,依据《医疗器械监督管理条例》(国务院令第 680 号)、《体外诊断试剂注册管理办法》(原国家食品药品监督管理总局令第 5 号)等相关医疗器械法规与配套规章,经系统评价后,建议准予注册。

2022 年 11 月 10 日

附件: 产品说明书

乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA) 测定试剂盒 (PCR-荧光探针法)

说明书

【产品名称】

通用名称: 乙型肝炎病毒 RNA (HBV-RNA) 测定试剂盒 (PCR-荧光探针法)

【包装规格】48 人份/盒

【预期用途】

本试剂盒用于体外定量测定人血清样本中的乙型肝炎病毒RNA (HBV-RNA)。

已有研究数据显示, 外周血清中HBV-RNA可反映肝内HBV病毒的转录活性, 在部分血清中HBV DNA低于检测下限的样本中, HBV-RNA仍可以被检测到。同时, 在NAs治疗中, 血清HBV-RNA可辅助作为HBeAg转阴的预测的指标之一, 血清HBV-RNA结果为阴性, 需要结合其他指标共同用于指导NAs的治疗。该检测结果不得作为患者病情评价的唯一指标, 必须结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。本试剂盒不得用于HBV的血液筛查。

【检验原理】

本试剂盒 (PCR-荧光探针法) 采用磁珠法提取血清中的HBV-RNA。特异性的检测HBV-RNA的保守区域。检测试剂内含有一条反转录引物、一对特异性扩增引物以及一条荧光探针, 与RT-PCR反应缓冲液, Taq酶, 逆转录酶等共同配制成RT-PCR反应液, 在实时荧光定量PCR仪上进行一步法RT-PCR扩增, 实现对血清样本中HBV-RNA的检测。

【主要组成成分】

	组成部分	规格/体积	主要组成成分
磁珠法核酸提取试剂	裂解液	10.0mL (1瓶)	1%SDS; 25mM Tris-HCl; 10mM EDTA
	磁珠溶液	1.0mL (1管)	Fe ₃ O ₄ 磁性颗粒
	洗液 1	15.0mL (1瓶)	400mM 氯化钠; 30mM Tris-HCl
	洗液 2	5.0mL (1瓶)	400mM 氯化钠; 0.5M 乙酸钾; 30mM Tris-HCl
	洗液 3	30.0mL (1瓶)	200mM 氯化钠; 30mM Tris-HCl
	洗脱液	2.5mL (1瓶)	10 mM 氯化钠; 10mM Tris-HCl
扩增反应试剂	HBV-RNA 内标	50μL (1管)	含内标片段的假病毒溶液
	DNA酶 I	100μL (1管)	DNA酶I, 甘油
	HBV-RNA 反应液 A	0.5mL (1管)	HBV-RNA特异性引物及探针、内标引物及探针、dNTPs、10×RT-PCR Buffer
	HBV-RNA 反应液 B	1.25mL (1管)	2×逆转录缓冲液、逆转录酶、TaqDNA聚合酶
	HBV-RNA 弱阳性质控品	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液
	HBV-RNA 强阳性质控品	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液
	阴性质控品A	1.0mL (1管)	阴性血浆/血清 (已灭活)
	阴性质控品B	1.0mL (1管)	含HBV-DNA目标片段的假病毒溶液
	HBV-RNA 阳性定量参考品 1	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁴ copies/mL)
	HBV-RNA 阳性定量参考品 2	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10 ⁵ copies/mL)

	HBV-RNA 阳性定量参考品 3	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10^6 copies/mL)
	HBV-RNA 阳性定量参考品 4	1.0mL (1管)	含HBV-RNA目标片段的假病毒溶液 (1.0×10^7 copies/mL)

备注:

- 1) 不同批号产品间的成分不得混用或互换。
- 2) 自备试验试剂及器材: 异丙醇、无水乙醇、1.5 mL 的 RNase-Free 离心管、PCR 反应管、移液器枪头 (建议使用带滤芯的枪头, 规格: 10 μ L、200 μ L、1000 μ L); 离心机; 震荡混合器; 磁珠分离器; 各种规格的移液器。

【储存条件及有效期】

本试剂盒有效期 6 个月, 避光密闭保存, 其中 A 盒 (磁珠法核酸提取试剂) 置于室温保存; B 盒 (扩增反应试剂) 置于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 保存。

B 盒 (扩增反应试剂) 应避免反复冻融, 冻融次数不超过 5 次; 试剂开瓶后, 在室温条件下放置时间不应超过 8 小时。

本试剂盒生产日期和失效日期见产品包装标签。

【适用仪器】

实时荧光定量 PCR 仪: ABI Prism 7500, LightCycler480, 杭州博日 9600plus。

【样本要求】

1. 适用标本类型: 血清。

2. 标本采集:

静脉采血后 24 小时内分离, 然后吸取上层血清, 转移至 1.5mL 灭菌离心管备用。

3. 样本保存:

经上述处理后的待测血清样本可立即用于检测, 或 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 保存 (3 个月)。可于 -70°C 以下长期保存 65 个月。应避免反复冻融。

【检验方法】

1. 试剂准备 (在试剂准备区进行)

1.1 取出两个包装盒中的各组分, 室温放置, 待其温度平衡至室温后, 混匀备用;

1.2 在裂解液中加入 5mL 异丙醇, 充分混匀后备用。

1.3 在洗液 1 中加入 10 mL 无水乙醇, 充分混匀后备用。

1.4 在洗液 2 中加入 20 mL 无水乙醇, 充分混匀后备用。

1.5 根据待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 的数量, 按照裂解液 300 μ L/人份+HBV-RNA 内标 1.0 μ L/人份的比例, 取相应量的裂解液及 HBV-RNA 内标, 充分混匀成裂解液 mix 备用。

1.6 根据待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 的数量, 按照 48 μ L/人份洗脱液+2.0 μ L/人份的 DNA 酶 I 比例, 取相应量的洗脱液及 DNA 酶 I, 充分混匀成洗脱液 mix 备用。

1.7 根据待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 的数量, 按照 HBV-RNA 反应液 A 10 μ L/人份+HBV-RNA 反应液 B 25 μ L/人份的比例, 取相应量的 HBV-RNA 反应液 A 及 HBV-RNA 反应液 B, 充分混匀成 PCR-mix, 按照 35 μ L/人份分装至 PCR 反应管中, 盖上 PCR 反应管盖, 瞬时离心后备用。

1.8 将上述准备好的试剂转移至样本处理区, 待用。

2. 样本处理 (在样本处理区进行) (阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品 (1~4) 与待测样本同步处理)

2.1 在 1.5mL 的 RNase-Free 离心管中依次加入 20 μ L 磁珠溶液 (使用前颠倒混匀或使用移液器吹吸混匀磁珠)、300 μ L 裂解液 mix、200 μ L 样本, 震荡混匀各离心管, 室温下颠倒混匀 10 分钟或反复吹吸混匀 10 分钟。

2.2 将离心管置于磁力架上 1 分钟, 使管内磁珠被吸附, 用移液器移走管内液体, 取下离心管。

2.3 加入 500 μ L 洗液 1, 使磁珠重新悬浮, 将离心管置于磁力架上 1 分钟, 使管内磁珠被吸附, 用移液器移走管内液体, 取下离心管。

2.4 加入 500 μ L 洗液 2, 使磁珠重新悬浮, 将离心管置于磁力架上 1 分钟, 使管内磁珠被吸附, 用移液器移走管内液体, 同时保持离心管置于磁力架上, 使磁珠继续被吸附。

2.5 加入 550 μ L 洗液 3, 尽量不要冲起磁珠, 1 分钟后用移液器移走管内液体, 取下离心管。

2.6 加入 50μL RNA 洗脱液 mix，使磁珠重新悬浮，37℃静置 15 分钟（样本处理前将水浴锅或金属浴温度设置成 37℃），期间轻轻晃动两次使核酸充分洗脱。

2.7 将离心管置于磁力架 1 分钟，使磁珠被吸附，将液体转移至新的 1.5mL 无核酸酶的离心管中。

2.8 取洗脱后的样本提取液 15μL，加入已经分装 35μL PCR-mix 的 PCR 反应管中，盖上管盖，瞬时离心，转移到扩增区备用，记录样本加入顺序。

2.9 如操作时，发现管壁和管盖有液体，请瞬时离心使液体甩入管底，再置于磁力架上。

3. PCR 扩增（在扩增与产物分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置）

3.1 将 PCR 反应管放入实时荧光定量 PCR 仪样品槽中，按对应顺序设置待测样本、阴性质控品 A 和 B、弱阳性质控品、强阳性质控品、阳性定量参考品（1~4）的数量，并设置样本名称及阳性定量参考品（1~4）的浓度。

3.2 荧光检测通道选择：

选择 FAM 通道检测 HBV-RNA，选择 HEX 或 VIC 通道检测 HBV-RNA 内标，设置 Sample Volume 为 50；ABI 仪器参比荧光（Reference Dye）选择 none。

3.3 反应程序设定：

反应程序	反应温度	反应时间	循环数
1	50℃	15min	1
2	95℃	5min	1
3	95℃	30s	10
	62℃	45s	
4	95℃	30s	35
	62℃	45s (在此步骤结束后收集荧光信号)	

设置完毕，保存文件，运行反应程序。

4. 结果分析（请参照各仪器使用说明书进行设置）

反应结束后自动保存结果，对 HBV-RNA 的曲线（FAM 通道曲线）和内标的曲线（VIC 或 HEX 通道曲线）分别进行分析。根据分析后图像调节 Base line 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 之间，End 值可设在 5-20 之间，调整阈值线位于扩增曲线指数期且阴性质控品 A 符合质量控制要求），点击 Analyze 进行分析，在 Report 界面查看结果，记录样本检测结果数值（C）。

5. 质量控制程序

每次实验均需检测阴性质控品、HBV-RNA 强阳性质控品、HBV-RNA 弱阳性质控品、HBV-RNA 阳性定量参考品（1~4）。质控品结果满足如下要求时，方可进行检测结果判定。

5.1 HBV-RNA 阴性质控品 A 和 B：检测结果均为阴性。

5.2 HBV-RNA 阳性质控品：检测结果均为阳性，HBV-RNA 强阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^7 \sim 5.0 \times 10^8$ copies/mL，HBV-RNA 弱阳性质控品定值范围在 $1.0 \times 10^4 \sim 5.0 \times 10^5$ copies/mL。

5.3 HBV-RNA 阳性定量参考品（1~4）：检测结果均为阳性，且标准曲线的相关系数 $R^2 \geq 0.98$ 。

以上要求需在实验中同时满足，否则本次实验无效，需重新测定。

【阳性判断值】

检测 249 例临床样本，利用 ROC 曲线分析确定靶标阳性判断值为 $Ct \leq 26$ 。

【检验结果的解释】

1. 阴性结果判定：FAM 通道无“S”型扩增曲线或 Ct 值 > 26 ，VIC/HEX 通道有明显“S”型扩增曲线，且 Ct 值 ≤ 32 。则样本未检测到 HBV-RNA，样本浓度低于试剂盒的检出限。

2. 阳性结果判定：FAM 通道为“S”型扩增曲线，并且 Ct 值 ≤ 26 ，VIC/HEX 通道扩增为“S”型曲线，且 Ct 值 ≤ 32 。

2.1 $C < 300$ copies/mL：检出浓度低于检出限，检测结果的阳性检出率 $< 95\%$ 。

- 2.2 $300 \leq C < 1.0 \times 10^3$ copies/mL: 检出浓度位于检出限与线性范围下限之间, 检测结果的阳性检出率 $\geq 95\%$ 。
- 2.3 $1.0 \times 10^3 \leq C \leq 1.0 \times 10^8$ copies/mL: 检出浓度位于线性范围内, 线性范围内相关系数 $r \geq 0.9800$ 。
- 2.4 $C > 1.0 \times 10^8$ copies/mL, 检出浓度高于线性范围上限, 如有必要, 可将样本用阴性质控品 A 或 B 稀释至线性范围内再检测。
3. 若内标 Ct 值 > 32 或者无显示, 则该样本的检测结果无效。

【检验方法的局限性】

样本检测结果与样本的收集、处理、运送及保存质量有关, 其中任何失误都可能导致检测结果的不准确。如果样本处理时未控制好交叉污染, 可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

- 准确性: 准确度参考品的检测结果为阳性, 且浓度的对数值与理论浓度的对数值的绝对偏差不得超过 ± 0.5 个对数数量级。
- 参考品符合率: 阴性参考品符合率, 阳性参考品符合率均为 100%。
- 检出限: 检出限为 300 copies/mL。
- 线性范围: 线性范围为 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^8$ copies/mL, 线性范围内相关系数 $|r| \geq 0.9800$ 。
- 精密度: 批内精密度 $CV \leq 5\%$ 。
- 经过对 HBV 基因型 A~G (A、E、F、G 为假病毒模拟样本, B、C、D 为临床样本) 验证, 临床研究中 HBV 基因型 B、C、D 验证, 本试剂盒可以检测 HBV 基因型 A~G。
- 试剂盒与人巨细胞病毒、EB 病毒、人类免疫缺陷病毒、丙型肝炎病毒、甲型肝炎病毒、梅毒、人类疱疹病毒 6 型、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、丙酸痤疮杆菌、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌等无交叉反应。
- 总胆红素 (≤ 28 mg/dL), 甘油三酯 (≤ 3000 mg/dL), 血红蛋白 (≤ 22 g/dL), 总 IgG (≤ 40 g/L) 对试剂盒的检测结果无干扰。
- HBV DNA 浓度小于等于 2×10^7 IU/mL 时对本试剂盒检测结果不产生干扰。
- 参考《慢性乙型肝炎防治指南》, 并结合临床验证数据分析, 推测在不同时期的慢性 HBV 感染者样本中, HBV RNA 的检出率为: 慢性 HBV 携带者 $> \text{HBeAg}$ 阳性的慢性乙型肝炎患者 $> \text{乙型肝炎肝硬化} > \text{HBeAg}$ 阴性的慢性乙型肝炎患者 $> \text{非活动性 HBsAg}$ 携带者。虽然不同期患者血清 HBV RNA 水平存在差异, 但临床决策还必须结合患者临床表现和其他实验室检测对病情进行综合分析。
- 临床评价: 在 3 家临床机构完成 1033 例样本的临床试验, 与参比方法相比, 阳性符合率为 99.26%、阴性符合率为 98.99%、总符合率为 99.13%; 在 $1.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^8$ copies/mL 范围内, 本产品与参比方法相比, 检测结果经线性回归方程分析, 二者无显著性差异。

慢性 HBV 感染者 NAs 抗病毒治疗的 HBeAg 阳性患者样本 78 例, 接受 NAs 治疗 48 周时血清 HBV-RNA 以 708 copies/mL 为阈值预测治疗五年时 HBeAg 转阴率, 其曲线下面积 (AUC) 为 0.874, 阳性预测值为 80.6%, 阴性预测值为 83.3%。

【注意事项】

- 本品仅用于体外检测, 实验前请仔细阅读本说明书。
- 实验前请熟悉和掌握需要使用的各种仪器的操作方法和注意事项, 对每次实验进行质量控制。
- 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范, 实验人员需要进行专业培训, 实行严格分区进行 (试剂准备区、样本处理区、扩增和产物分析区), 所有耗材应为灭菌后一次使用或购买 RNase-Free 的耗材, 实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备, 各区域用品不能交叉使用。
- 为避免样本中的潜在生物危险, 所有检测样本应视为具有传染性物质, 实验过程中应穿工作服, 带一次性手套并经常替换手套避免交叉污染; 样本操作和废弃物处理均应符合相关法规要求: 卫生部《微生物生物医学实验室生物安全通用准则》和《医疗废物管理条例》。
- 所有试剂在使用前, 均需要在室温下充分融化、混匀后使用, 但应避免反复冻融; 试剂盒各组分应在有效期内使用, 且不同批次产品间不能混用。
- 样本核酸提取后, 建议立即进行下一步实验, 否则请保存于 $-20 \pm 5^\circ\text{C}$ 待用 (24h 内), 长期保存应置于 -70°C 以下环境中保存。
- 实验结束后用 10% 次氯酸或 75% 酒精处理工作台和移液器, 然后用紫外线灯照射 20~30 分钟。

【标识的解释】

	查阅使用说明		体外诊断医疗器械
---	--------	---	----------

	A 盒温度极限 (10°C~ 30°C)		B 盒温度极限 (-15°C~-25°C)
	不得二次使用		

【参考文献】

1. Jie Wang, Tao Shen, Xiangbo Huang, et al., Serum Hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound [J]. Journal of Hepatology, 2016.
2. 鲁凤民, 王杰, 庄辉. HBV RNA 病毒样颗粒的潜在临床意义 [J]. 中华肝病病杂志, 临床肝胆病杂志, 《肝脏》杂志. 2016, 32 (9): 1635-1636.

【基本信息】

注册人/生产企业名称: 北京热景生物技术股份有限公司

住所: 北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街 9 号 9 幢

联系方式:

售后服务单位名称: 北京热景生物技术股份有限公司

联系方式:

生产地址: 北京市大兴区中关村科技园区大兴生物医药产业基地天富街 9 号 9 幢

生产许可证编号:

【医疗器械注册证编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】



医课汇
公众号
专业医疗器械资讯平台
WECHAT OF
HLONGMED



hlongmed.com
医疗器械咨询服务
MEDICAL DEVICE
CONSULTING
SERVICES



医课培训平台
医疗器械任职培训
WEB TRAINING
CENTER



医械宝
医疗器械知识平台
KNOWLEDG
ECENTEROF
MEDICAL DEVICE



MDCPP.COM
医械云专业平台
KNOWLEDG
ECENTEROF MEDICAL
DEVICE