

受理号：CSZ2100047

体外诊断试剂产品注册技术审评报告

产品中文名称：乙型肝炎病毒核糖核酸（HBV RNA）检测试剂盒
(PCR-荧光探针法)

产品管理类别：第三类

申请人名称：圣湘生物科技股份有限公司

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	6
三、临床评价概述	12
四、产品受益风险判定	14
综合评价意见	17

基本信息

一、申请人名称

圣湘生物科技股份有限公司

二、申请人住所

长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

三、生产地址

长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

技术审评概述

一、产品概述

(一) 产品主要组成成分

本试剂盒包括逆转录、荧光 PCR 扩增反应试剂，主要组成成分见表 1。

表 1 主要组成成分

序号	试剂名称	规格与装量	主要成分
1	HBV RNA 反应液	588 μL/管 × 1 管	引物、探针、dNTPs、PCR buffer
2	HBV RNA 酶混合液	96 μL/管 × 1 管	Tth酶、Taq酶
3	RT 增强剂	50 μL/管 × 1 管	硫酸锰
4	HBV RNA 定量参考品 A	500 μL/管 × 1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+07copies/mL)
5	HBV RNA 定量参考品 B	500 μL/管 × 1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+06 copies/mL)
6	HBV RNA 定量参考品 C	500 μL/管 × 1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+05copies/mL)
7	HBV RNA 定量参考品 D	500 μL/管 × 1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+04 copies/mL)
8	HBV RNA 阴性对照	500 μL/管 × 1 管	灭活的阴性血清
9	HBV RNA 阳性对照	500 μL/管 × 1 管	含目标片段的假病毒
10	HBV RNA 内标	50 μL/管 × 1 管	含内标片段的假病毒

备注：

- 1.不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。
- 2.本试剂盒定量参考品溯源至制造商选定测量程序。
- 3.自备试验器材：无 DNA 酶、RNA 酶的 1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管；台式离心机；台式振荡混合器；磁珠分离器、各种规格的加样枪及相应 Tip 头(10 μ L, 200 μ L, 1000 μ L)。所有的反应管都需经无 RNase 处理。
- 4.提取试剂盒使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂(湘长械备 20150021 号)进行核酸提取。

(二) 产品预期用途

本试剂盒用于体外定量检测临床血清样本中的乙型肝炎病毒 (HBV) RNA。

乙型病毒性肝炎（乙肝）是由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）引起的、以肝脏炎性病变为主并可引起多器官损害的一种传染病，临幊上以疲乏、食欲減退、肝肿大、肝功能异常为主要表现。人感染乙型肝炎病毒（HBV）后，病毒持续未被清除者可能发展为慢性肝炎，如果不进行适当的干预，约 15% ~ 40% 的慢性乙型肝炎病毒（HBV）感染者最终将发生肝硬化、终末期肝病及肝癌。因此，乙型肝炎病毒（HBV）感染者应积极进行抗病毒治疗，并监测其病毒载量变化。本试剂盒通过对经核昔（酸）类似物治疗、乙型肝炎表面抗原浓度低于 1500 IU/mL 的病例，检测血清中乙型肝炎病毒（HBV）RNA，

用于该人群经核昔（酸）类似物联合干扰素治疗后乙型肝炎表面抗原转阴的提示。

（三）产品包装规格

24人份/盒。

（四）产品检验原理

本试剂盒通过逆转录 HBV 核酸中的 pgRNA，利用针对 HBV pgRNA 序列设计的一组特异性引物与荧光探针，配以 PCR 反应液，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现 HBV pgRNA 的定量检测。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），通过检测内标基因来监测提取核酸中是否具有 PCR 抑制物，评价核酸提取的质量，避免 PCR 假阴性。

二、临床前研究概述

（一）主要原材料

1. 主要原材料的选择

本产品在制备过程中主要原材料包括引物、荧光探针、dNTPs (T)、Tth DNA Polymerase (Tth 酶)、Taq 酶、HBV RNA 假病毒、HBV RNA 内标假病毒等，主要原材料为外购方式获得。申请人选择有资质的供应商提供的原料，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的质量标准并经检验合格。

2. 企业参考品和对照品的设置情况

本产品企业参考品包括阳性参考品、阴性参考品、线性参考品、检出限参考品和精密度参考品。参考品采用临床样本和假病毒制备而成。组成如下：

阳性参考品 6 份 (P1 ~ P6)：由含不同乙肝病毒型别 (B 型、C 型、D 型) 与浓度的 6 份乙型肝炎病毒核糖核酸 (HBV RNA) 阳性样本组成。

阴性参考品 8 份 (N1 ~ N8)：N1 ~ N3 为正常人乙型肝炎病毒阴性血清样本；N4 ~ N8 为种属相近的或引起症状相似的病毒，分别为丙型肝炎病毒（两份）戊型肝炎病毒、巨细胞病毒、EB 病毒阳性样本。

线性参考品 8 份 (L0 ~ L7)：由不同浓度的乙型肝炎病毒核糖核酸 (HBV RNA) 假病毒组成。经标定的乙型肝炎病毒核糖核酸 (HBV RNA) 强阳性假病毒，用阴性血清分别稀释至 1.0×10^9 copies/mL、 1.0×10^8 copies/mL、 1.0×10^7 copies/mL、 1.0×10^6 copies/mL、 1.0×10^5 copies/mL、 1.0×10^4 copies/mL、 1.0×10^3 copies/mL、 1.0×10^2 copies/mL，即企业线性参考品 L0 ~ L7。

检出限参考品 3 份 (S1 ~ S3)：来源于 1 份乙型肝炎病毒阳性血清样本，使用企业线性参考品定值后，用阴性血清稀释至 5000 copies/mL，编号为 S，使用时用阴性血清分别稀释至 100 copies/mL，50 copies/mL 和 25 copies/mL，编号分别为 S1，S2 和 S3。

精密度参考品 2 份 (R1 ~ R2)：经标定的乙型肝炎病毒核

糖核酸 (HBV RNA) 强阳性假病毒, 用阴性血清分别稀释至 1.5×10^4 copies/mL、 1.5×10^2 copies/mL 两个浓度, 编号 R1 和 R2。

本产品设置了 HBV RNA 阴性对照和 HBV RNA 阳性对照, 用于检测过程中试剂盒和仪器的质量控制。此外, PCR 检测体系含有阳性内对照 (内标), 通过检测内标基因来监测提取核酸中是否具有 PCR 抑制物, 评价核酸提取的质量, 避免 PCR 假阴性。

(二) 生产工艺及反应体系研究

申请人对生产工艺及反应体系的研究包括核酸提取方法研究、样本用量研究、核酸用量研究; 对引物探针离心时间、不同温度和时间复溶等进行优化; 对 PCR buffer、引物、探针、Taq 酶、Tth 酶、dNTPs (T) 等的用量进行了优化; 对 HBV RNA 反应液、HBV RNA 定量参考品、HBV RNA 阳性对照及 HBV RNA 内标在 2-8°C 不同保存时间进行研究; 并对反应条件进行优化, 包括逆转录温度、逆转录时间、预变性时间、退火和延伸温度、循环数的选择研究。

申请人通过企业内部研究试验, 确定了最佳的生产工艺及反应体系。

(三) 分析性能评估

本产品分析性能包括核酸提取方法研究、测量范围、准确度、检出限与定量限、精密度、分析特异性、包容性, 申请人提交了三批试剂, 在适用机型(ABI7500 荧光 PCR 仪、SLAN-96P

全自动医用 PCR 分析系统、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪) 上的性能评估资料。

1. 核酸提取

申请人使用 HBV RNA 阳性样本，使用圣湘的核酸提取或纯化试剂和凯杰 (QIAamp Viral RNA Mini Kit (50)) 的提取试剂盒进行对比研究，结果核酸提取或纯化试剂与对照试剂无明显区别，相对提取效率高。

2. 测量范围

申请人使用 HBV RNA 强阳性血清为初始样本，用阴性血清稀释至 1.0×10^9 copies/mL ~ 1.0×10^2 copies/mL，分别使用三批质检合格的试剂盒进行检测，结果均符合线性范围的性能要求。

3. 准确度

申请人将乙型肝炎病毒 RNA 检测试剂国家标准品稀释 100 倍后作为待测样本，分别使用三批质检合格的试剂盒进行检测，结果样本浓度对数值与理论对数值的绝对偏差均不超过 ± 0.5 个对数数量级，符合准确度的性能要求。

4. 检出限与定量限研究

将已定值的 HBV RNA 阳性样本用阴性血清进行梯度稀释，分别使用三批质检合格的试剂盒进行检测，确定本试剂盒的最低检出限为 50 copies/mL，定量限为 100 copies/mL。使用三批质检合格的试剂盒对不同型别 (B 型、C 型、D 型) 的 HBV RNA

阳性样本进行检出限与定量限的验证，结果均符合检出限与定量限的性能要求。

5. 分析特异性研究

以正常人乙型肝炎阴性血清，丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、甲型肝炎病毒、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、HIV、梅毒、痤疮丙酸杆菌、人类疱疹病毒 6 型及 HBV DNA 阳性样本作为待测样本，使用三批质检合格的试剂盒在适用仪器上检测，检测结果均为阴性，说明试剂盒具有很好的特异性。

在内源/外源干扰物质研究中，采用三批质检合格的试剂盒，对各种可能的干扰物质进行评价。结果显示血红蛋白（ ≤ 2 g/dL）、总胆红素（ ≤ 28 mg/dL）、甘油三酯（ ≤ 3 g/dL）、总 IgG（ ≤ 40 mg/mL）、干扰素 2a（9 ng/mL）、拉夫米定（300 μ g/mL）、干扰素 2b（250 ng/mL）、恩替卡韦（100 μ g/mL）等对试剂盒的检测结果无影响。

6. 精密度研究

选择 HBV RNA 阴性样本、HBV RNA 临界阳性样本、HBV RNA 弱阳性样本、HBV RNA 强阳性样本作为待测样本，分别使用三批质检合格的试剂盒进行检测，进行为期 21 天的检测，结果显示三批试剂盒检测 HBV RNA 阴性样本的阳性检出率均为 0%，检测临界阳性检出率均为 100%。对于检测弱阳性及强阳性样本，三批试剂盒日间、不同操作者间、不同设备间、不

同试验地点间检测强阳性样本的浓度对数值 CV 均小于 5%; 弱阳性样本的浓度对数值 CV 均小于 10%，符合精密度的性能要求。

7. 包容性研究

选择不同型别（B 型、C 型、D 型）HBV RNA 高、中、低及检出限浓度样本，分别使用三批质检合格的试剂盒进行检测，结果高、中、低浓度样本检测浓度平均对数值的绝对偏差均不超过 ± 0.5 个对数数量级，高、中浓度对数值的 CV 值均不超过 5%，低浓度对数值的 CV 值不超过 10%，检出限浓度样本均为阳性，符合包容性的性能要求。

（四）阳性判断值研究

1. 阳性判断值研究-准确性部分

选择已确认的 HBV RNA B、C、D 型阳性样本分别 52 份、54 份、11 份和 60 份临床 HBV RNA 阴性血清样本，用质检合格的 HBV RNA 试剂盒进行检测，然后进行 ROC 曲线分析，确定目标基因检测的 Ct 阳性判断值为 40。

2. 阳性判断值研究-有效性部分

本次研究对 82 位受试者(接受 NAs 联合干扰素抗病毒治疗，且同时满足 HBsAg ≤ 1500 IU/mL, HBeAg 阴性，HBV DNA 定量低于检测下限的感染者)的血清样本进行 HBV RNA 定量检测，每位受试者采集 2 个标本，分别对应治疗开始时和治疗 48 周后两个不同检测点，检测其 HBV RNA 浓度。结果分析显示，

通过治疗开始时（第 0 周）血清中 HBV RNA 定量值预测治疗期(48 周)血清样本中 HBsAg 阴转受试者工作特征曲线(ROC)分析，得出 HBV RNA 检测浓度对提示 NAs 联合干扰素治疗后 HBsAg 阴转的阈值为 624.5copies/mL，此时灵敏度为 84.8%，特异性为 69.4%。

（五）稳定性研究

申请人对本产品的货架稳定性、加速破坏稳定性、冻融稳定性、开盖稳定性、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样本的有效保存时间。

货架稳定性：将三批试剂储存于 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ，分别在第 0、3、6、9、12、13 和 14 个月对试剂盒的外观、阴阳性符合率、最低检出限、线性、准确度、精密度进行考察，各项性能指标均符合要求。结果表明：本试剂盒在 $-20 \pm 5^{\circ}\text{C}$ 条件下，储存 14 个月后检测，性能稳定。

此外，申请人对本产品的加速破坏稳定性、冻融稳定性、开盖稳定性、运输稳定性以及样本稳定性进行了研究，结果显示，产品的性能均满足产品说明书声称的要求。

三、临床评价概述

申请人在中南大学湘雅医院、中南大学湘雅二医院、兰州大学第二医院共 3 家机构完成了临床试验，临床试验包括两部分研究。

第一部分研究为试验体外诊断试剂与临床参考方法检测结果的一致性。该部分研究入组人群为乙型肝炎病毒感染病例，经核昔(酸)类似物治疗，乙肝表面抗原低于 1500 IU/mL, HBeAg 阴性、DNA 低于检测下限的人群。临床参考方法选择数字 PCR 法。共入组病例 855 例，其中阳性病例 363 例，阴性病例 492 例，入组人群中包括乙型肝炎病毒 B 亚型 168 例，C 亚型 129 例，D 亚型 33 例。试验结果显示：针对定性统计分析，试验体外诊断试剂与临床参考方法检测 HBV RNA 的阳性符合率百分比为 99.72% (95% CI: 98.47% ~ 99.99%)，阴性符合率百分比为 100% (95% CI: 99.25% ~ 100%)；针对定量统计分析，检测结果在试验体外诊断试剂与临床参考方法法定量线性范围内的病例 330 例，试验体外诊断试剂检测结果与临床参考方法检测结果进行回归分析，回归方程为 $y = -0.004 + 1.000x$, r^2 为 0.998。将试验体外诊断试剂检测结果与临床参考方法检测结果进行 Bland-Altman 分析，95%一致性界限为 (-0.1301 ~ 0.1363)，一致性界限满足临床要求。综上，试验体外诊断试剂与临床参考方法检测结果一致性良好。

第二部分研究为针对核昔(酸)类似物经治，乙肝表面抗原低于 1500 IU/mL 的病例，检测血清中乙型肝炎病毒(HBV) RNA，用于该人群经核昔(酸)类似物联合干扰素治疗后乙肝表面抗原阴转的提示的临床意义研究。该部分研究入组人群为乙型肝炎病毒感染病例，经核昔(酸)类似物治疗，乙肝表面

抗原低于 1500 IU/mL, HBeAg 阴性、DNA 低于检测下限的人群。病例数为 142 例。针对该部分病例开始研究时进行试验体外诊断试剂的检测，随后进行核昔（酸）类似物与干扰素联合治疗，对该部分病例进行 0 周、12 周、24 周、48 周四个时间节点的随访，观察病例乙肝病毒表面抗原阴转情况。入组病例中乙肝病毒表面抗原阴转病例 48 例，未阴转病例 94 例。临床试验结果显示，以乙型肝炎病毒 RNA 浓度为 624.5 copies/mL 为阳性判断值，试验体外诊断试剂提示乙肝病毒表面抗原阴转的灵敏度为 91.67%，特异度为 72.34%。针对经随访后乙肝病毒表面抗原阴转与未阴转的病例试验体外诊断试剂检测 RNA 浓度进行分析，乙肝病毒表面抗原阴转的病例初始检测 RNA 浓度较低，且在随访过程中呈下降趋势。

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

本产品根据 YY/T 0316-2016 医疗器械风险管理对医疗器械产品的安全风险分析方式，对本产品进行风险分析。

（一）受益评估

本试剂盒通过对经核昔（酸）类似物治疗、乙型肝炎表面抗原浓度低于 1500 IU/mL 的病例，检测血清中乙型肝炎病毒（HBV）RNA，用于该人群经核昔（酸）类似物联合干扰素治疗后乙型肝炎表面抗原转阴的提示。

(二) 风险评估

申请人对已知危险（源）进行风险评价，按照风险可接受准则判断每个危险（源）的风险是否达到可接受水平，对合理可行降低的风险、不经过风险/收益分析既判定为不可接受的风险采取控制措施，并对具体措施进行实施验证，同时重新对采取措施后的风险进行估计，确认其风险水平是否可接受。但为保证用械安全，基于对主要剩余风险的规避，需要在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检测临床血清样本中的乙型肝炎病毒（HBV）RNA。

乙型病毒性肝炎（乙肝）是由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）引起的、以肝脏炎性病变为主并可引起多器官损害的一种传染病，临幊上以疲乏、食欲減退、肝肿大、肝功能異常为主要表现。人感染乙型肝炎病毒（HBV）后，病毒持续未被清除者可能发展为慢性肝炎，如果不进行适当的干预，约15%~40%的慢性乙型肝炎病毒（HBV）感染者最终将发生肝硬化、终末期肝病及肝癌。因此，乙型肝炎病毒（HBV）感染者应积极进行抗病毒治疗，并监测其病毒载量变化。本试剂盒通过对经核昔（酸）类似物治疗、乙型肝炎表面抗原浓度低于1500 IU/mL的病例，检测血清中乙型肝炎病毒（HBV）RNA，用于该人群经核昔（酸）类似物联合干扰素治疗后乙型肝炎表

面抗原转阴的提示。

2. 警示及注意事项：该试剂盒说明书中明确了该试剂盒检测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体外诊断试剂产品注册，属于优先审批项目。申请人的注册申报资料符合现行要求，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》（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，经对申请人提交的注册申报资料进行系统评价，申报产品符合安全性、有效性的要求，符合现有认知水平，建议准予注册。

2024 年 5 月 27 日

附件：产品说明书

乙型肝炎病毒核糖核酸(HBV RNA)检测试剂盒(PCR-荧光探针法)说明书

【产品名称】
通用名：乙型肝炎病毒核糖核酸(HBV RNA)检测试剂盒(PCR-荧光探针法)

【包装规格】 24 人份/盒

【预期用途】
本试剂盒用于体外定量检测临床血清样本中的乙型肝炎病毒（HBV）RNA。

乙型病毒性肝炎（乙肝）是由乙型肝炎病毒（Hepatitis B Virus, HBV）引起的、以肝脏炎性病变为主并可引起多器官损害的一种传染病，临幊上以疲乏、食欲减退、肝肿大、肝功能异常为主要表现。人感染乙型肝炎病毒（HBV）后，病毒持续未被清除者可能发展为慢性肝炎，如果不进行适当的干预，约 15%~40% 的慢性乙型肝炎病毒（HBV）感染者最终将发生肝硬化、终末期肝病及肝癌。因此，乙型肝炎病毒（HBV）感染者应积极进行抗病毒治疗，并监测其病毒载量变化。本试剂盒通过对经核昔（酸）类似物治疗、乙型肝炎表面抗原浓度低于 1500 IU/mL 的病例，检测血清中乙型肝炎病毒（HBV）RNA，用于该人群经核昔（酸）类似物联合干扰素治疗后乙型肝炎表面抗原转阴的提示。

【检验原理】
本试剂盒通过逆转录 HBV 核酸中的 pgRNA，利用针对 HBV pgRNA 序列设计的一组特异性引物与荧光探针，配以 PCR 反应液，在荧光定量 PCR 仪上，应用实时荧光定量 PCR 检测技术，通过荧光信号的变化实现 HBV pgRNA 的定量检测。

PCR 检测体系含有阳性内对照（内标），通过检测内标基因来监测提取核酸中是否具有 PCR 抑制物，评价核酸提取的质量，避免 PCR 假阴性。

【主要组成部分】
本试剂盒包括逆转录、荧光 PCR 扩增反应试剂，由以下组成：

序号	试剂名称	规格与装量	主要成分
1	HBV RNA 反应液	588μL/管×1 管	引物、探针、dNTPs、PCR buffer
2	HBV RNA 酶混合液	96μL/管×1 管	Tth酶、Taq酶
3	RT 增强剂	50μL/管×1 管	硫酸锰
4	HBV RNA 定量参考品 A	500μL/管×1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+07 copies/mL)
5	HBV RNA 定量参考品 B	500μL/管×1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+06 copies/mL)
6	HBV RNA 定量参考品 C	500μL/管×1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+05 copies/mL)
7	HBV RNA 定量参考品 D	500μL/管×1 管	含目标片段的假病毒 (3.00E+04 copies/mL)
8	HBV RNA 阴性对照	500μL/管×1 管	灭活的阴性血清
9	HBV RNA 阳性对照	500μL/管×1 管	含目标片段的假病毒
10	HBV RNA 内标	50μL/管×1 管	含内标片段的假病毒

备注：

- 1) 不同批号产品的成分之间不可以混用或互换。
- 2) 本试剂盒定量参考品溯源至制造商选定测量程序。
- 3) 自备试验器材：无 DNA 酶、RNA 酶的 1.5 mL 离心管、0.2 mL PCR 反应管；台式离心机；台式振荡混合器；磁珠分离器、各种规格的加样枪及相应 Tip 头(10μL, 200μL, 1000μL)。所有的反应管都需经无 RNase 处理。
- 4) 提取试剂盒使用本公司生产的核酸提取或纯化试剂（湘长械备 20150021 号）进行核酸提取。

【储存条件及有效期】

1. 试剂应避光密闭保存于 -20±5°C。试剂盒有效期为 12 个月。
2. 生产日期，失效日期请见外包装盒。
3. 不使用时，这些试剂在包装标识的效期内可稳定存放。一旦使用，扩增试剂盒反复冻融应不超过 3 次。

【适用仪器】
适用于 ABI7500 荧光 PCR 仪、SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统、雅睿 MA-6000 荧光 PCR 仪。

【样本要求】

1. 适用样本类型：血清样本。
2. 样本采集：用无菌注射器抽取受检者静脉血 2mL，注入无菌收集管，室温不超过 4 小时，待样本自行析出血清，或直接室温 1600rpm 离心 5 分钟，分离出血清，转移到 1.5mL 离心管中备用。
3. 样本保存：经上述处理后的待测样本可立即用于检测，或 -20±5°C 保存（12 个月），-70°C 保存（24 个月），反复冻融不超过 3 次。

【检验方法】

1. 试剂准备（在试剂准备区进行）
 - 1.1 取出盒中的各组分，室温放置，待其温度平衡至室温后，混匀后备用；
 - 1.2 根据待测样本、定量参考品 A~D、阳性对照、阴性对照数量，按比例（HBV RNA 反应液 24.5 μL/人份+HBV RNA 酶混合液 4 μL/人份+RT 增强剂 1.5μL/人份）取相应量的反应液、酶混合液与 RT 增强剂，充分混匀成 PCR-混合液，瞬时离心后备用。HBV RNA 内标按 1μL/人份加入到推荐试剂盒的提取溶液 1 中；
 - 1.3 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）（HBV RNA 阴性对照、HBV RNA 阳性对照、HBV RNA 定量参考品 A~D 与待测样本同步处理）
 - 2.1 核酸提取与 DNA 消化：按推荐的核酸提取或纯化试剂提取待测样本、HBV RNA 阳性对照、HBV RNA 阴性对照、HBV RNA 定量参考品 A~D，并对提取后的待测样本核酸进行 DNA 消化，处理完后的核酸待用。
 - 2.2 取 2.1 中处理后的产物：分别 20μL 的待测样本、HBV RNA 阳性对照、HBV RNA 阴性对照、HBV RNA 定量参考品 A~D 加入到 30μL 配制好的 PCR-混合液中，在荧光 PCR 仪上进行荧光定量 PCR 的检测。
3. PCR 扩增（在扩增与分析区进行）（请参照各仪器使用说明书进行设置，以 SLAN-96P 全自动医用 PCR 分析系统为例）
 - 3.1 将 PCR 反应管放入扩增仪样品槽，设置阴性对照、阳性对照、定量参考品 A~D 以及待测样本，并设置样本名称及定量参考品浓度。

— 1 —

3.2 荧光检测通道选择：选择 FAM 通道检测 HBV RNA 的靶标；2) 选择 HEX/VIC 通道检测 HBV RNA 的内标。

3.3 循环参数设定：

步骤	温度	时间	循环数
1 预变性和酶激活	95℃	1 分钟	1
2 逆转录	60℃	30 分钟	1
3 cDNA 预变性	95℃	1 分钟	1
4 变性	95℃	15 秒	45
5 退火, 延伸及荧光采集	60℃	30 秒*	
6 仪器冷却	25℃	10 秒	1

(*注：由于 ABI7500 仪器原因，不能设置为 30 秒，可以设置为 31 秒。)

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 的曲线分析。Baseline 的设置：Baseline 一般设置为 3-15 个循环，具体可根据实际情况进行调整。其调整原则为：选择指数扩增前荧光信号较稳定的区域，起点(Start)避开荧光采集起始阶段的信号波动，终点(End)比最早出现指数扩增的样本 Ct 减少 1-2 个循环。Threshold 的设置：设定原则以阈值线刚好超过正常阴性对照品的最高点，一般取扩增斜率 1/3-1/2 处。

5. 质量控制

5.1 HBV RNA 阴性对照：FAM 通道无 Ct 值显示，HEX/VIC 通道 Ct≤35。

5.2 HBV RNA 阳性对照：检测浓度值介于 3.00E+04~3.00E+06 copies/mL。

5.3 四个 HBV RNA 定量参考品：均检测为阳性，且线性相关系数 | r | ≥0.98。

5.4 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。

【阳性判断值】

准确性：检测经数字 PCR 方法确定阴阳性的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 177 例，利用 ROC 曲线法确定本试剂盒检测目标基因的 Ct 阳性判断值为 40。

有效性：以 82 位接受 NAs（拉米夫定、阿德福韦、恩替卡韦、替诺福韦单用或上述药物间联合使用）联合干扰素抗病毒治疗的慢性乙型肝炎患者为随访队列样本，通过记录基线（0 周）及 NAs 联合干扰素治疗期（48 周）的检测指标，分析基线血清 HBV RNA 水平，与 NAs 联合干扰素治疗 48 周时血清 HBsAg 阴转之间的关系。经过受试者工作特征曲线（ROC）分析得出 HBV RNA 检测浓度对提示 NAs 联合干扰素治疗后 HBsAg 阴转的阈值为 624.5copies/mL，此时灵敏度为 84.8%，特异性为 69.4%。

【检验结果的解释】

1 阴性结果判定：FAM 通道无 Ct 值显示或 Ct 值>40，且 HEX/VIC 通道 Ct 值≤35，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 Ct 值≤40，且 HEX/VIC 通道 Ct 值≤35。

2.1 对于测定值在 1.00E+02 copies/mL~1.00E+09 copies/mL 之间的样本，报告相应的测定结果。

2.2 对于测定值>1.00E+09 copies/mL 的样本，报告注明>1.00E+09 copies/mL。若需精确定量可稀释 100 倍后再复测。

2.3 待测样本测定值≥50 copies/mL，而<1.00E+02 copies/mL 的样本，表明病毒载量低，测定值仅供参考。

2.4 对于测定值<50 copies/mL 的样本，同时内标检测为阳性且 Ct≤35，则报告 HBV RNA 含量低于试剂盒检测下限。

3 若内标不正常 (Ct>35 或无数值)，则该样本的检测结果无效，应查找并排除原因，并对此样本进行重复实验。

【检验方法的局限性】

样本检测结果与样本收集、处理、运送及保存质量有关，其中任何失误都将会导致结果不准确。如果样本处理时没有控制好交叉污染，可能出现假阳性结果。

【产品性能指标】

检出限及定量限：本试剂盒的最低检出限为 50 copies/mL，最低定量限为 1.00E+02 copies/mL。

精密度：本试剂盒检测高浓度精密度参考品 1.50E+04 copies/mL，浓度对数值的变异系数均≤5%；低浓度精密度参考品 1.50E+02 copies/mL，浓度对数值的变异系数均≤10%。

线性范围：本试剂盒的线性范围为 1.00E+02 copies/mL~1.00E+09 copies/mL，线性相关系数|r|≥0.98。

抗干扰物检测能力：内源性干扰物血红蛋白（≤2g/dL）、总胆红素（≤28mg/dL）、甘油三酯（≤3g/dL）、总 IgG（≤40mg/mL）对检测无影响。

分析特异性：对正常人乙型肝炎阴性血清，丙型肝炎病毒、戊型肝炎病毒、巨细胞病毒、EB 病毒、甲型肝炎病毒、单纯疱疹病毒 1 型、单纯疱疹病毒 2 型、甲型流感病毒、金黄色葡萄球菌、白色念珠菌、HIV、梅毒、痤疮丙酸杆菌、人类疱疹病毒 6 型及 HBV DNA 阳性样本无交叉反应。

临床性能：在 3 家临床单位完成 855 例样本的准确性研究，结果待考评试剂与对照方法检测 HBV RNA 总体的阳性符合率百分比为 99.72% (95% CI: 98.47%~99.99%)，阴性符合率百分比为 100% (95% CI: 99.25%~100%)，总符合率百分比为 99.88% (95% CI: 99.35%~100%)。

有效性研究共入组 142 位受试者，结果：通过 NAs 联合干扰素抗病毒治疗开始时（第 0 周）患者血清中 HBV RNA 浓度水平提示治疗后第 48 周血清样本中 HBsAg 阴转，以 624.5copies/mL 为阈值提示治疗后第 48 周 HBsAg 阴转的灵敏度为 91.67%，特异性为 72.34%。

【注意事项】

1. 本品仅用于体外诊断，使用前请仔细阅读本说明书。
2. 试验前请熟悉和掌握需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。
3. 实验室管理应严格按照 PCR 基因扩增实验室的管理规范，实验人员必须进行专业培训，实验过程严格分区进行，所用消耗品应洁净，且一次性使用，实验操作的每个阶段使用专用的仪器和设备，各区各阶段用品不能交叉使用。
4. 所有检测样品应视为具有传染性物质，实验过程中穿工作服，戴一次性手套并经常替换手套以避免样品间的交叉污染；样本操作、废弃物处理均需符合相关法规要求：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》。
5. 所有的试剂在使用前，均需在室温下充分融化，酶混合液易粘着于管壁，使用前请瞬时离心数秒。

6. 试剂盒采用泡沫箱加蓄冷剂的方式运输 5 天，温度不超过 20℃不影响产品有效期。
7. 本试剂盒中的阴、阳性对照以及定量参考品由假病毒和阴性血清制备而成，为保证产品在运输、使用过程中的安全，我们按照国家 CFDA 印发的《血液制品去除/灭活病毒技术方法及验证指导原则》，选择巴氏消毒法，即 60℃水浴 10 小时进行灭活。同时对阴性血清进行 HIV、HBV、HCV 的检测，结果全部为阴性。

【基本信息】

注册人/生产企业名称：圣湘生物科技股份有限公司

住所：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

联系方式：传真号码：

售后服务单位名称：

联系方式：传真号码：

生产地址：长沙高新技术产业开发区麓松路 680 号

生产许可证编号：

【医疗器械注册证书编号/产品技术要求编号】

【说明书核准日期及修改日期】