

浅谈 病毒性肝炎诊疗进展 与PCR实验室自动化

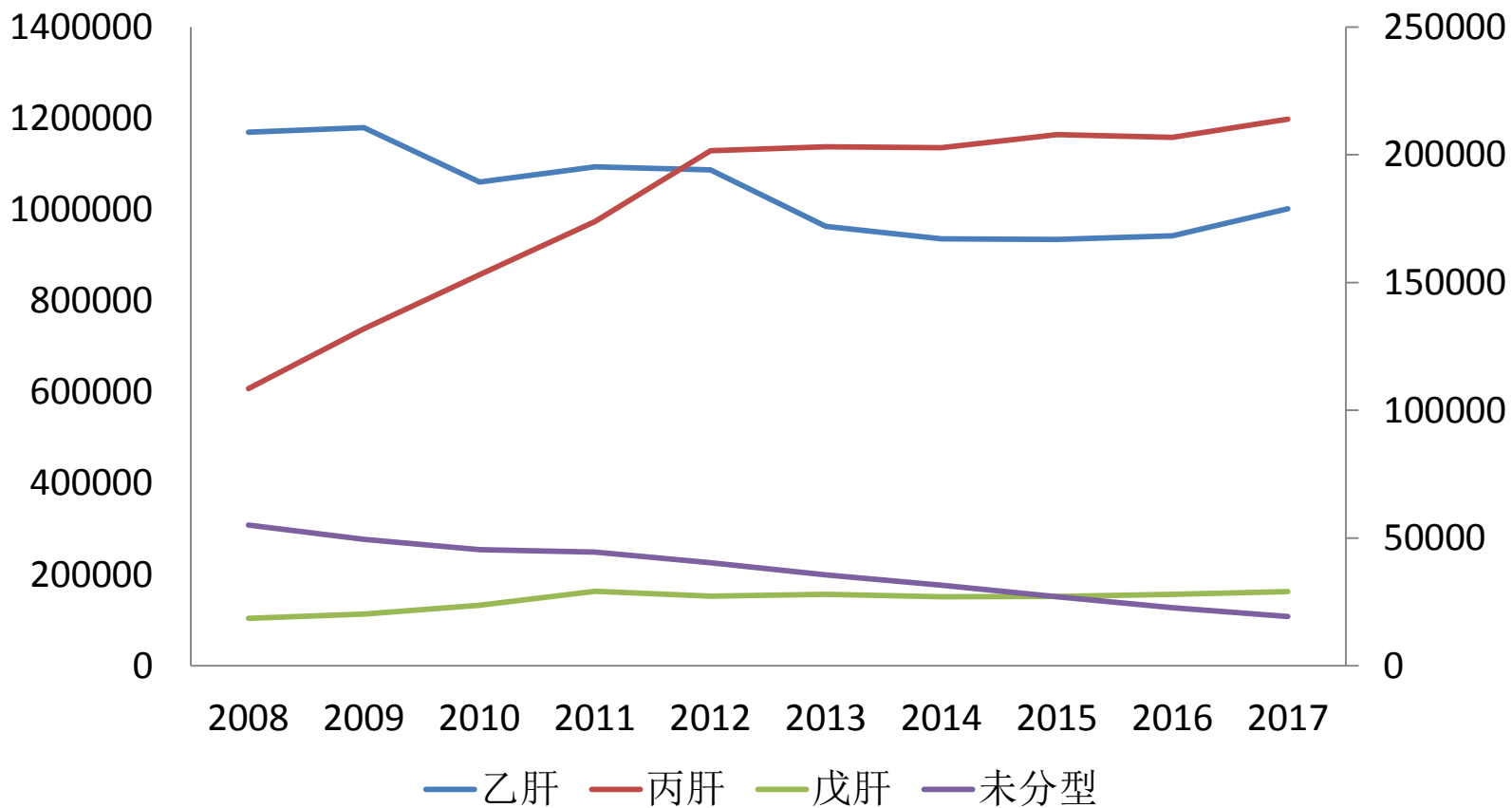


Presenter 杨梅强 珀金埃尔默诊断事业部

Date 2018.4.10



近十年肝炎发病数流行趋势



丙肝呈明显上升趋势

乙肝和戊肝发病数趋稳

未分型肝炎呈下降趋势

各种指南的出台和更新为乙肝丙肝规范临床诊治提供依据



临床需求



检测能力?

检测稳定性?

灵敏的PCR检测方法检测不到HBV DNA作为治疗终点的重要指证

➤ 在多个国家和地区的慢乙肝防治指南，均把用灵敏的PCR检测方法检测不到HBV DNA作为治疗终点的重要指证

- 2008年美肝会《慢乙肝防治指南》：

HBV DNA病毒载量应尽可能小于或等于10IU/ml。

- 2010年欧肝会EASL指南指出：

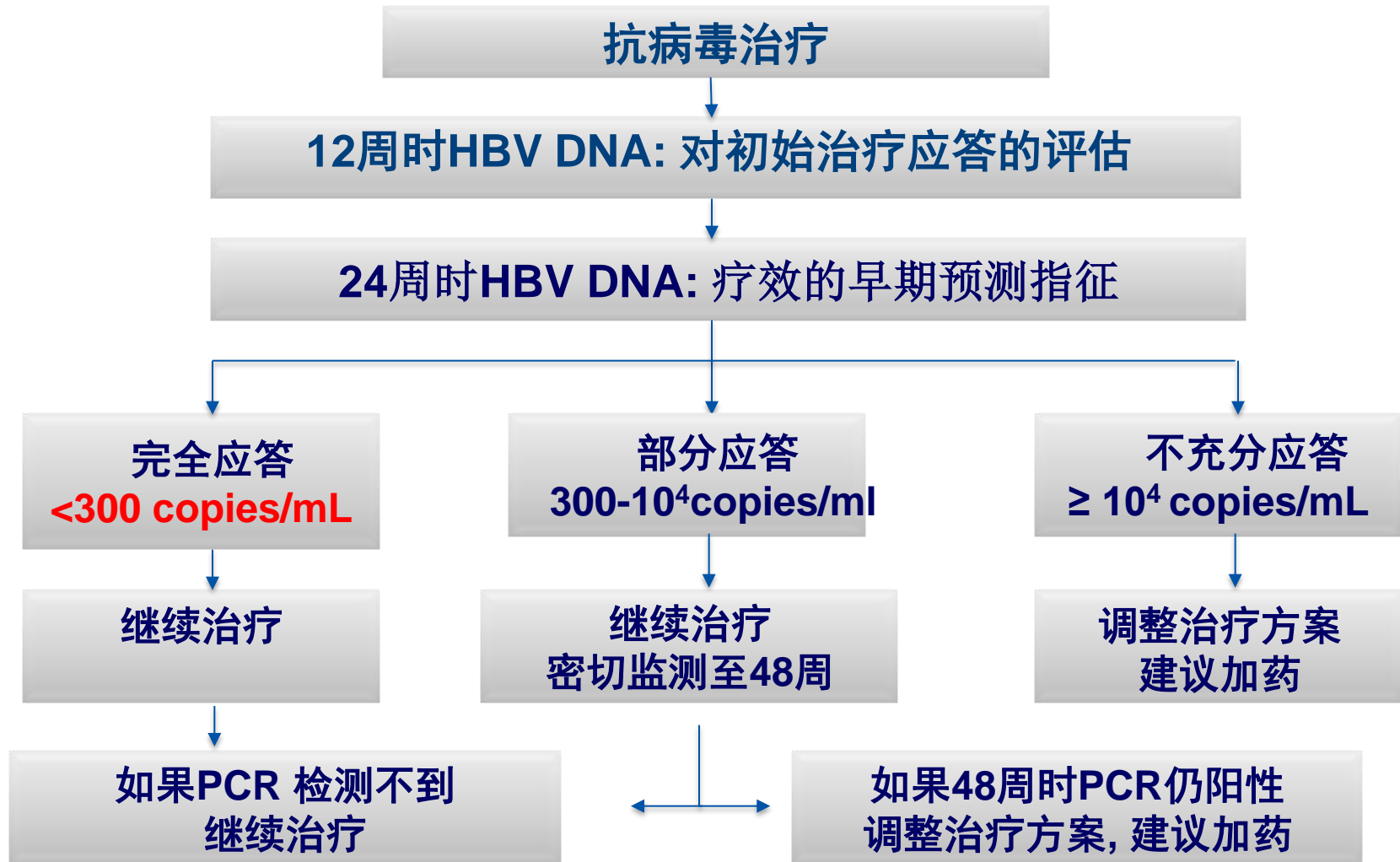
将HBV DNA病毒载量尽可能控制在10-15 IU/ml，能有效防止疾病的复发。

- 2015年中国慢乙肝防治指南指出：

最大限度地长期抑制HBV,减轻肝细胞炎症坏死及肝纤维化，延缓和减少肝脏失代偿、肝硬化、HCC及其并发症的发生，从而改善生活质量和延长存活时间。

建议用灵敏度高的HBV DNA检测试剂，监测慢性HBV感染的病毒复制水平。

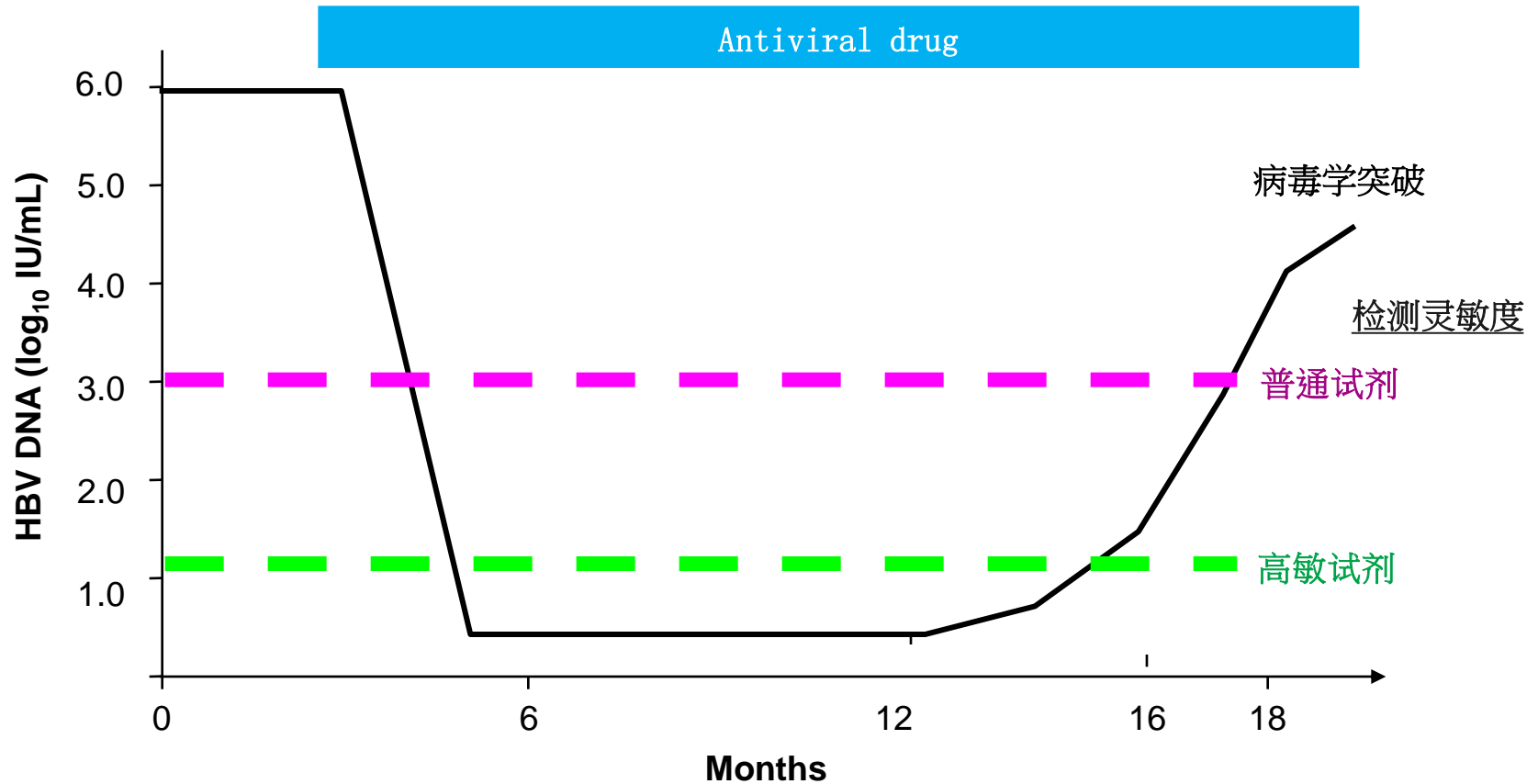
《管理慢性乙型肝炎口服治疗患者的路线图》



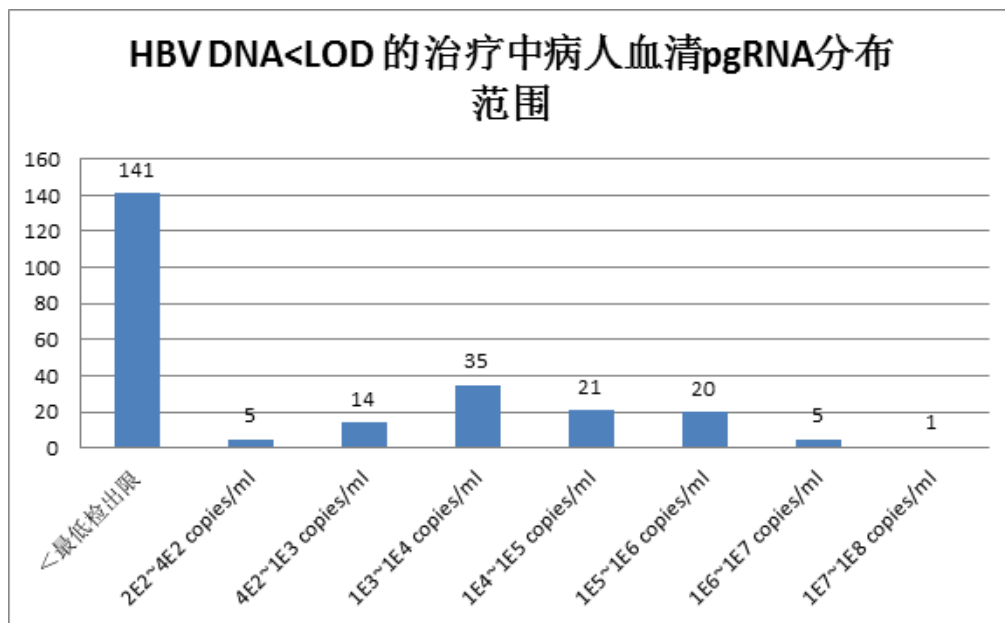
300 copies 约为60IU/ml

应用HBV DNA 监测NAs治疗

灵敏度更高的试剂，更及时发现病毒学突破



乙肝抗病毒治疗新Marker——HBV RNA

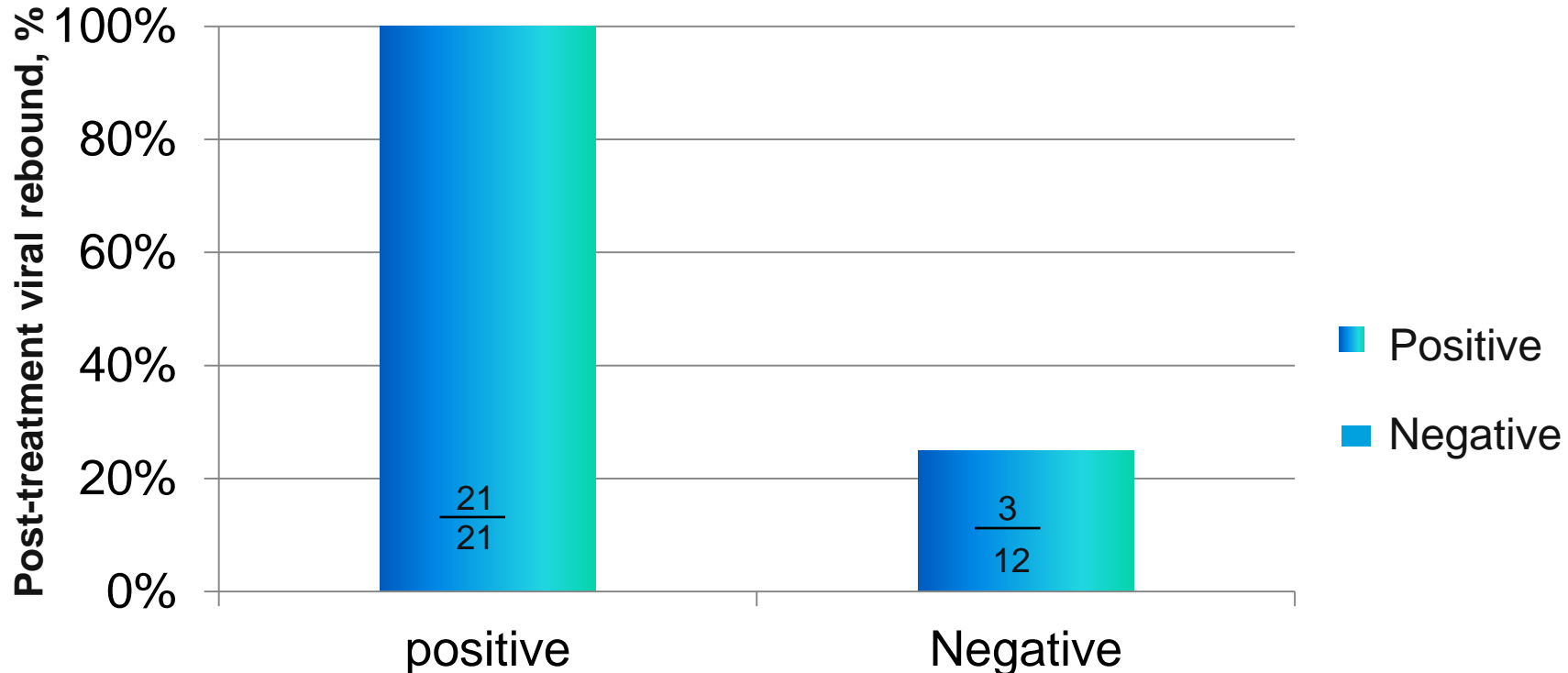


- 浙江某医院HBV RNA 242 例样本均为 HBV DNA 浓度 < 30 IU/ml （科华试剂）
- 42%(101/242)的样本在治疗过程中 HBV DNA 为阴性的样本 HBV RNA 为阳性。

- HBV RNA 是乙肝抗病毒治疗过程中的新Marker，间接反映cccDNA的转录活性，准临床治愈新指标。
- 临床项目合作：十三五项目及国内大型传染病医院
- HBV RNA RUO 试剂 服务与ICL 合作

临床意义-预测停药后病毒学反弹

Serum HBV Pre-genomic RNA Predicts Risk of Relapse after discontinuation of Nucleos(t)ide Analogues



HBV RNA in serum might be associated with risk of viral rebound and relapse after the discontinuation of NUCs-therapy

Wang J et al. Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound. Journal of Hepatology 2016 vol. 65 j 700-710.

临床意义-反映cccDNA的活性

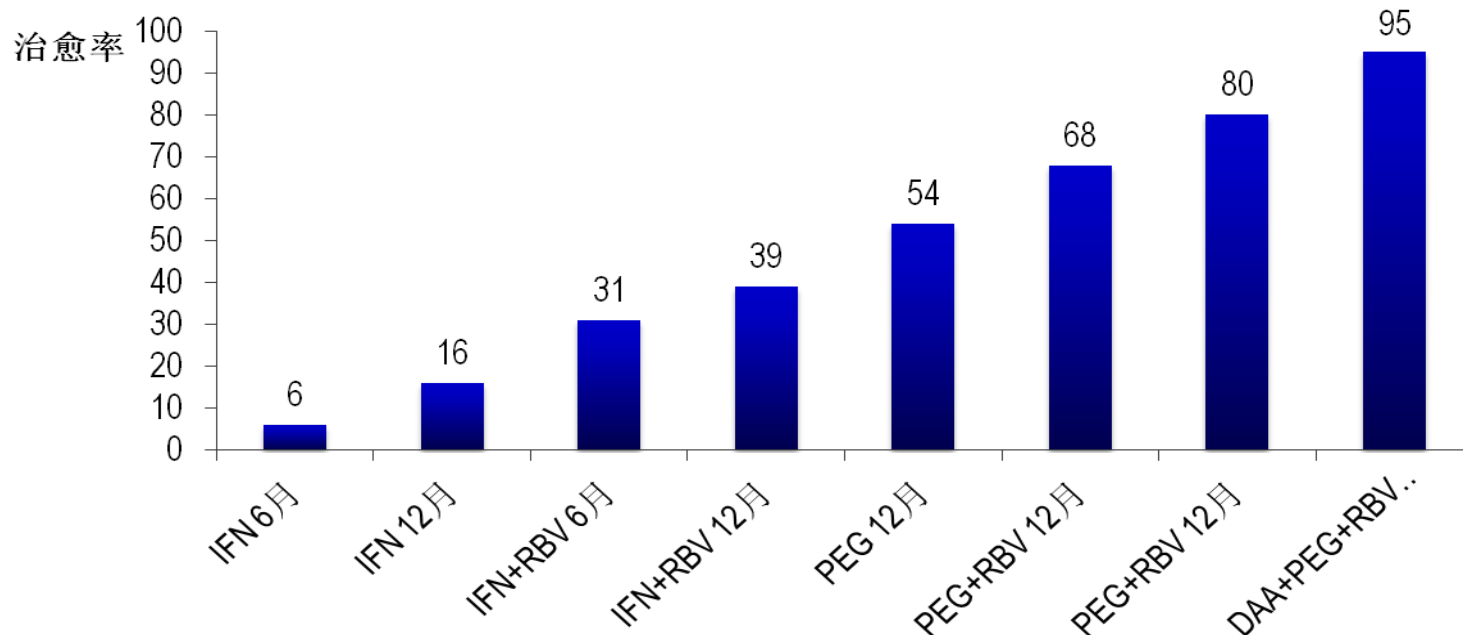
- HBV cccDNA没有彻底清除或者仍处于活性状态，是复发的根本原因。现有的指标HBsAg等无法精准反映cccDNA的转录活性
- HBV RNA由cccDNA转录而来，且不受整合入人基因组HBV DNA的影响
- 研究发现，外周血清HBV RNA与cccDNA相关，是反映cccDNA数量和转录活性的潜在，新的特异标志物

1. Journal of Hepatology 2017 vol. 66 j 454–467. Reply to: “Serum HBV pgRNA as a clinical marker for cccDNA activity”. Consistent loss of serum HBV RNA might predict the “para-functional cure” of chronic hepatitis B

2. Fengmin Lu et al.. Potential use of serum HBV RNA in antiviral therapy for chronic hepatitis B in the era of nucleos(t)ide analogs

丙肝迎来了“快速可治愈时代”

CFDA: 百时美施贵宝盐酸达拉他韦片（**Daclatasvir**）和阿舒瑞韦软胶囊（**Asunaprevir**）、西安杨森的西美瑞韦胶囊（**Simeprevir**）、吉利德（**Gilead**）的索磷布韦片（**Sofosbuvir**）、艾伯维（**AbbVie**）达塞布韦片和奥比帕利片。这些**DAA**覆盖了所有的作用靶点，可以实现**95%**以上丙肝患者的治愈。



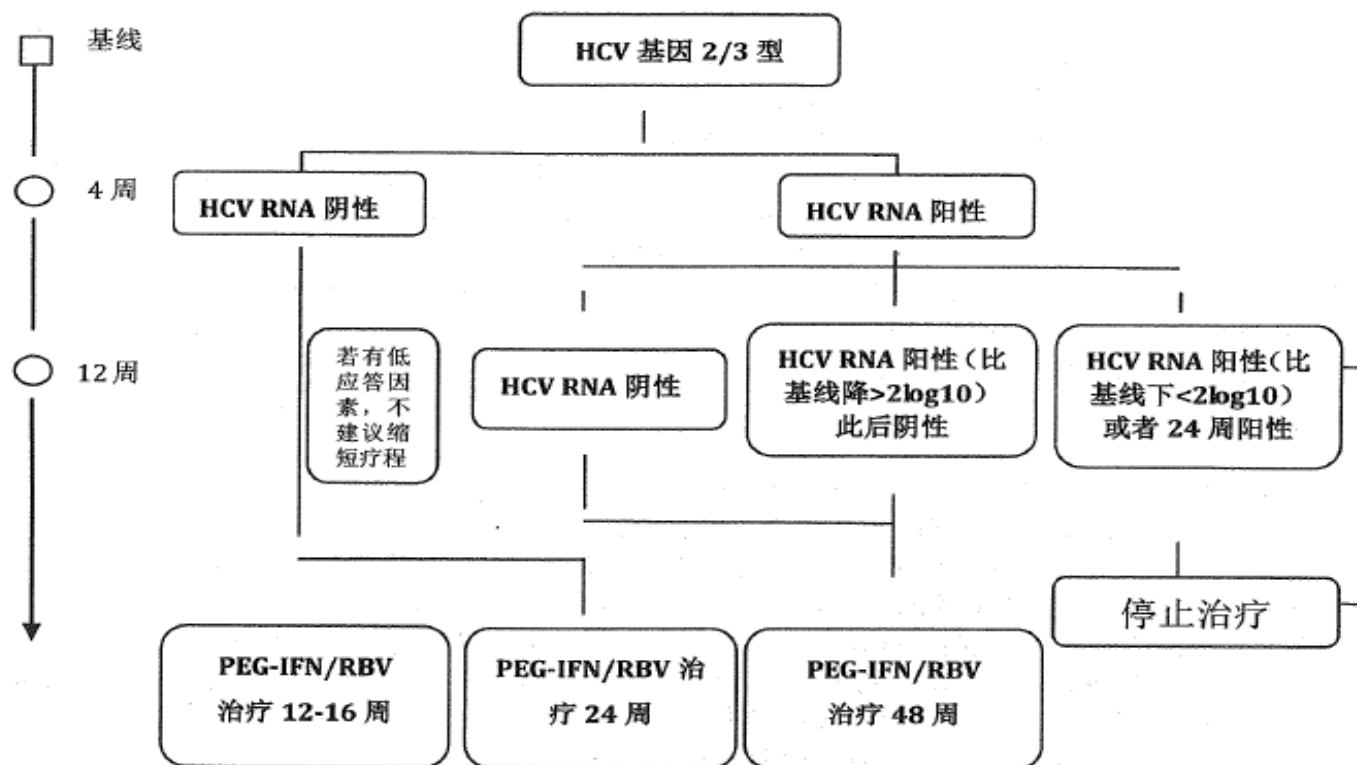


图3: HCV基因2/3型患者接受PEG-IFN联合利巴韦林过程中根据病毒学应答指导治疗。

建议在0周、4周、12周和24周采用高灵敏度方法检测HCV RNA (最低检测下线:<15IU/mL)。

低应答因素: 胰岛素抵抗、代谢综合征、重度肝纤维化或肝硬化、年龄较大。

临床需求



检测能力?

检测稳定性

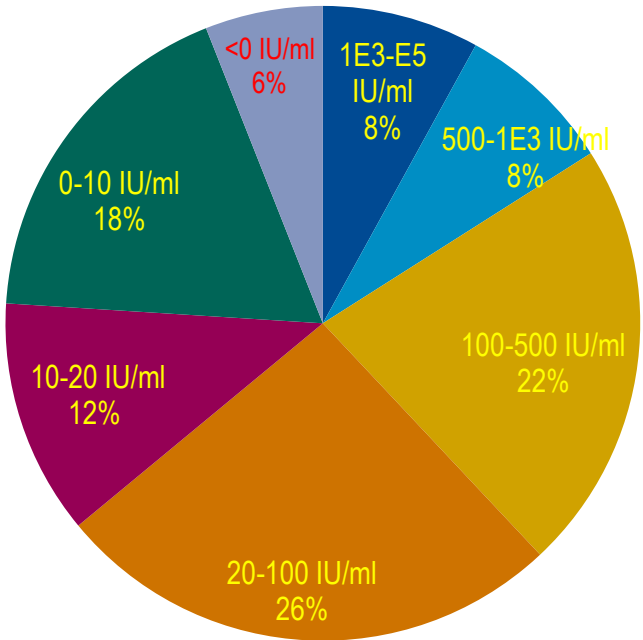
	煮沸法PCR	Perkinelmer-高敏PCR
灵敏度	500-1000 IU/mL	10 IU/mL
PCR上样量	4ul	40ul
体系	40ul	60ul
提取DNA 方法学	煮沸法	磁珠法
核酸纯度	杂质多 扩增效率低	纯度高 扩增效率高
优缺点	易断裂 不易纯化 离心、加热 手工操作 通量低	稳定 提取效率高-专利磁珠 易分离 易于自动化 易于高通量

与国内普敏HBV 低于500 IU/ml 样本结果测评分析

表1 相对符合率分析

试验		普敏法		合计
		阳性	阴性	
PerkinElmer	阳性	0	47	47
	阴性	0	3	3
合计		0	50	50

50例普敏试剂临床阴性样本，PE高敏试剂实测结果



简要分析：

- ❑ 国产试剂HBV PCR试剂<500IU/ml的样本**50例**，均报告阴性结果；
- ❑ 使用Perkinelmer HBV PCR试剂只检出3例阴性，其余**47例**均有检测结果；
- ❑ <10IU/ml样本数9例，10-20IU/ml样本数6例，>20IU/ml浓度以上假阴性率达到**64%以上**，且个别结果达到**E4 E5高浓度样本漏检**；

可见普敏法**HBV 定量试剂临床漏检率特别高**，给临床诊治带来错误的诊断治疗依据。

贵州省某三甲医院超敏HBV对比报告

仪器名称	ABI VIIA 7	项目	HBV-DNA
测定时间	2017.5.22	签名	
样本编号	PE结果		参考结果
1	-		-
2	8.7E1		-
3	6.8E1		-
4	1.98E2		1.45E2
5	3.98E4		9.56E3
6	4.8E1		-
7	1.27E3		-
8	-		-
9	4.85E6		7.13E5
10	1.82E2		-
11	-		-
12	2.91E2		-
13	5.9E4		1.51E4
14	2E2		-
15	9E4		4.61E3
16	1.5E7		1.57E6

❑ 16例待检样本中：

科华检出6例阳性，检出率是**37.5%**；

PerkinElmer 检出13例阳性，检出率是**81%**；多检出7例阳性，且有4例**E3 & E2**漏检

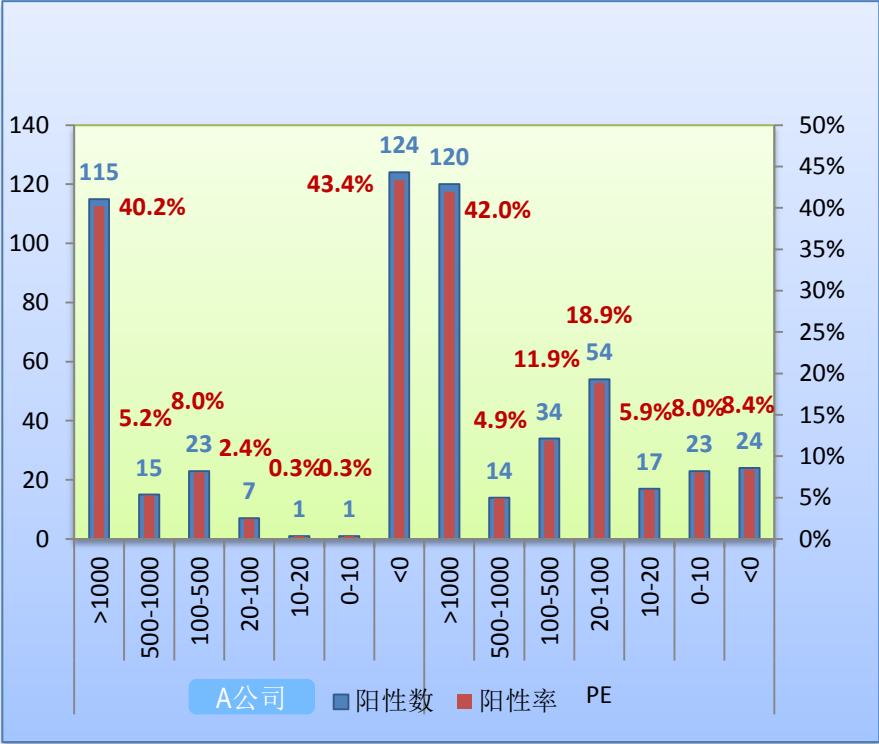
❑ 抽查2、7号样本免疫结果，结果显示都是两对半1、5阳性，证明确实为漏检样本。

❑ 普通的**HBV**定量对比超敏**HBV**试剂漏检情况严峻。

与特殊方法学 HBV PCR试剂 样本结果测评对比分析

表2 相对符合率分析

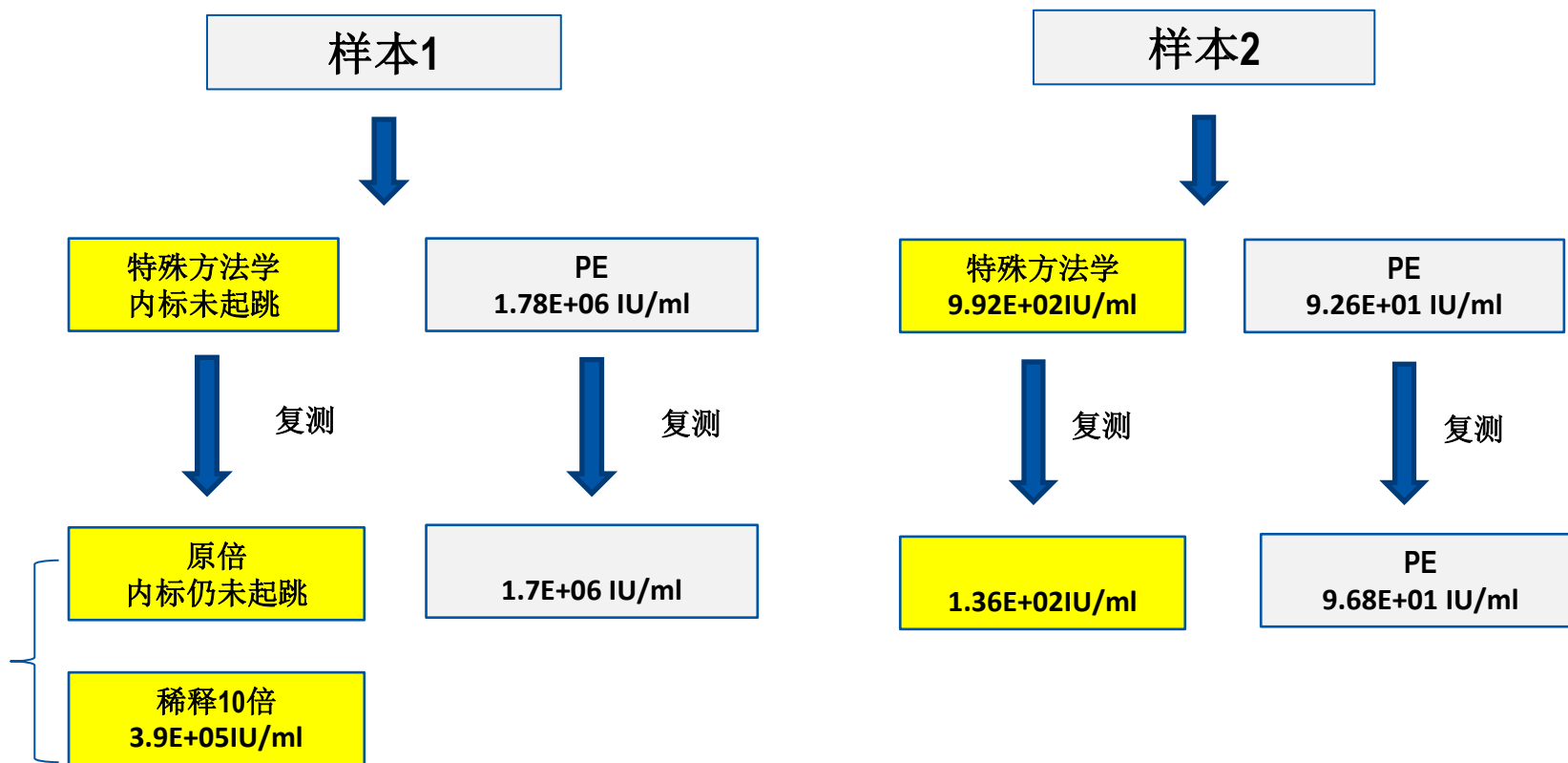
试验		特殊HBV方法学		合计	特殊方法学漏检
		阳性	阴性		
PerkinElmer	阳性	0	92	92	↓
	阴性	0	64	64	
合计		0	156	156	



HBV PCR试剂对比情况分析:

- PE与某特殊方法学试剂平行对比
HBV样本，总计286例；
- 某特殊方法学HBV定量下限
500IU/ml，即有**156**个样本报阴性或无结果，PE定量下限20IU/ml，总计**64**个样本不报结果。实际有**92**个弱阳性标本被漏报，占总检测数量的**32.17%**，占总阴性样本的**58.9%**，风险相当大。

与特殊方法学 HBV PCR试剂 样本结果测评对比分析



特殊方法学法 HBV PCR试剂对比情况分析:

- ❑ 两例样本结果两种试剂差异较大，复测；
- ❑ 特殊方法学HBV试剂检测准确性差，因杂质未去除，试剂抗干扰能力差，重复性差，不稳定。
- ❑ PE HBV 高敏试剂抗干扰能力强，稳定，重复性好。



乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则

2013年05月17日 发布

 乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则.doc

成败的关键环节。因此，无论申报产品是否含有 DNA 分离/纯化的组分，企业都应对核酸提取的环节做详细的验证。临床标本中可能含有各式各样的 PCR 抑制物，因此，对于 DNA 提取试剂的选择，除最大量分离出目的 DNA 外，还应有纯化步骤，尽可能去除 PCR 抑制物。目前常见的 DNA 分离纯化方法和改良方法各有优势和不足，申请人应结合申报产品的特性，合理选择 DNA 分离/纯化试剂，并提供详细的验证资料（提取效率、与后续试验的配合等）。

2. 最低检出限与定量限（分析灵敏度）

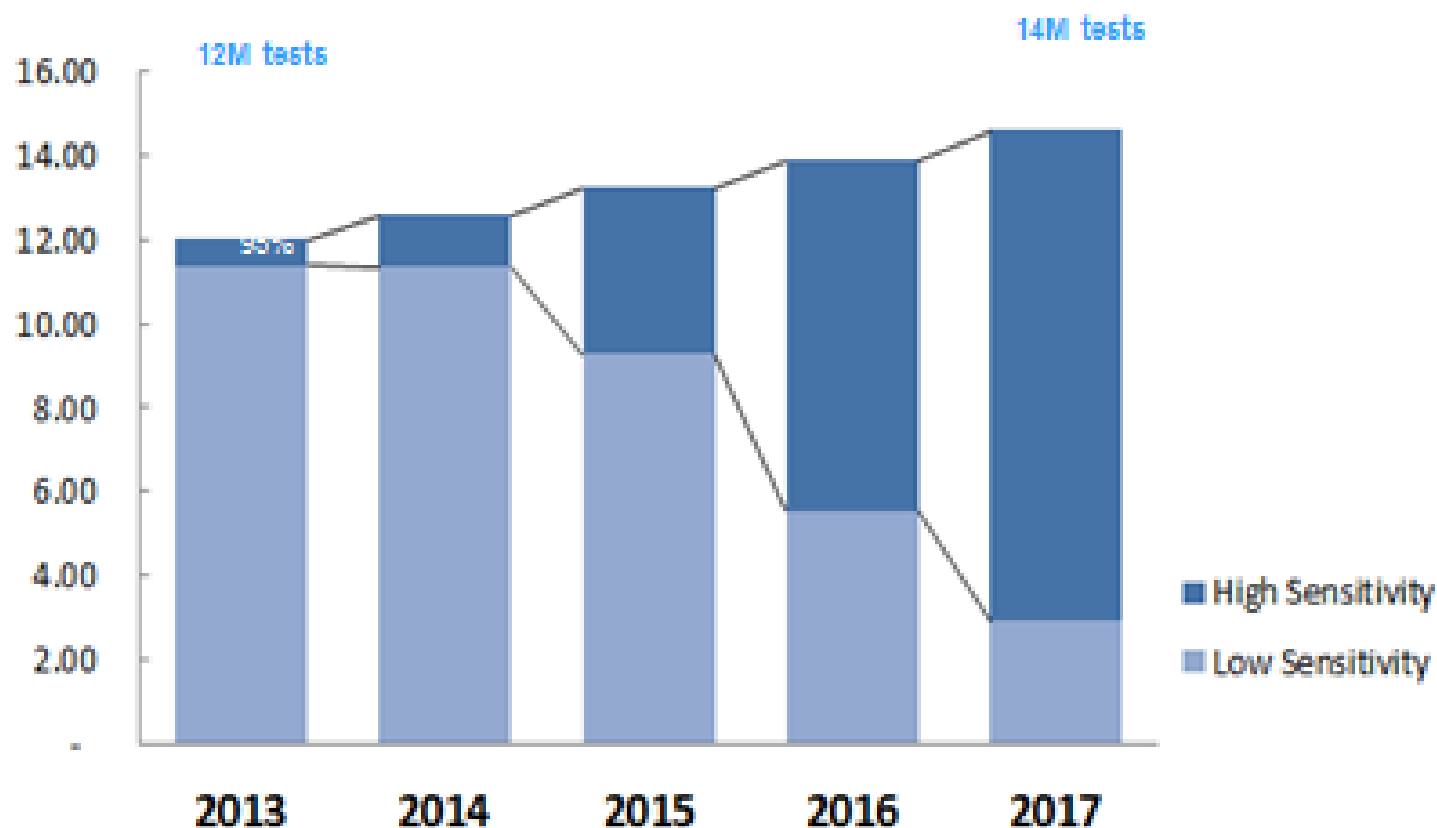
（1）最低检出限与定量限的确定

建议使用国际参考品/国家参考品进行梯度稀释并多次检测，将具有 95%以上阳性检出率的病毒水平作为最低检出限。建议最低检出限应不高于 30IU/ml。

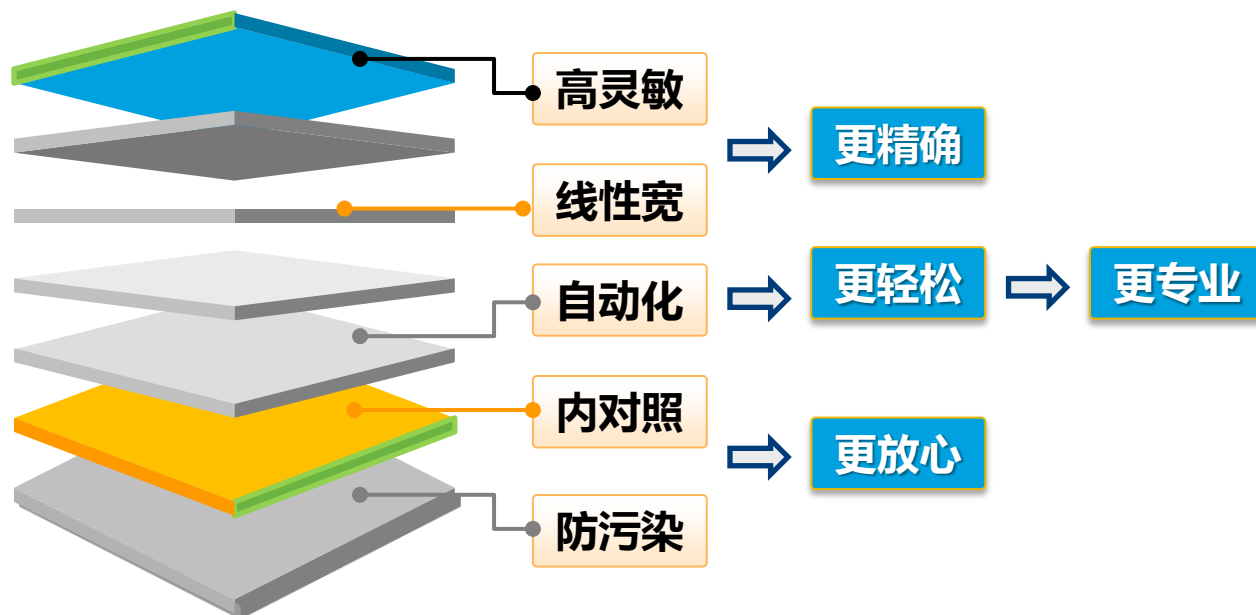
定量限应高于或等于检出限，将多次（至少 10 次）测量的结果符合

- ▶ 普通煮沸法试剂正在淘汰
- ▶ 临床高敏HBV PCR试剂需求迫切
- ▶ PCR实验室的全自动化平台解决方案已成为现实
- ▶ 高敏HBV PCR解决方案多样化

Large & Growing Market, Increasing in Importance



PerkinElmer 高敏HBV&HCV 试剂特点



HBV 检测下限: **10** IU/ml 线性范围: 20-10⁹ IU/ml

HCV 检测下限: **15** IU/ml 线性范围: 30-10⁹ IU/ml

浙江要求医院开展高敏HBV项目前 一定要用性能验证考核

(二) 增设“高敏乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸测定”项目，备注：最低检测限至少30IU/mL。

性能验证！

乙型肝炎病毒核酸定量测定试剂 盒性能验证的主要内容

- 最低检测限
- 定量检测限
- 精密度评价（批内精密度、批间精密度）
- 准确度评价
- 线性定量范围评价
- 防污染能力评价

广西地区高敏HBV/HCV PCR收费标准出台

广西新增医疗服务项目价格表（第一批）

序号	财务分类	项目编码	项目名称	项目内涵	除外内容	计价单位	三级医疗机构最高价格（元）
一、新增医疗服务项目							
1	H	250310062	抗缪勒氏管激素检测（电化学发光法）	定量检测。样本类型：血液。样本采集、签收、处理，定标和质控，检测样本，审核结果，录入实验室信息系统或人工登记，发送报告；按规定处理废弃物；接受临床相关咨询。		项	275
2	H	250403053E	梅毒螺旋体特异抗体测定（时间分辨荧光免疫法）	样本类型：血液。样本采集、签收、处理，加免疫试剂，温育，检测，质控，审核结果，录入实验室信息系统或人工登记，发送报告；按规定处理废弃物；接受临床相关咨询。		项	50
3	H	250104036	胎儿纤维连接蛋白（fFN）测定	样本类型：宫颈阴道分泌物。样本采集、签收、处理，加免疫试剂，温育，检测样本，审核结果，录入实验室信息系统或人工登记，发送报告；按规定处理废弃物；接受临床相关咨询。		次	198
4	H	250403082	高敏乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测	检测灵敏度显著高于普通PCR，符合乙型肝炎治疗指南。样本类型：血清及其他合适标本。样本采集、接收、前处理，提取模板，扩增，质控和定标，审核结果，录入实验室信息系统或人工登记，发送报告；按规定处理废弃物；接受临床相关咨询。		次	308
5	H	250403083	高敏丙型肝炎病毒核糖核酸定量检测项目	检测灵敏度显著高于普通PCR，符合丙型肝炎治疗指南。样本类型：血清及其他合适标本。样本采集、接收、前处理，提取模板，扩增，质控和定标，审核结果，录入实验室信息系统或人工登记，发送报告；按规定处理废弃物；接受临床相关咨询。		次	308
				样本类型：血液。样本采集、签收、处理，定标和质控，检测样本，审核结果，			

广西地区高敏HBV /HCVPCR 收费标准出台**308元/次**，原传统煮沸法收费标准为47元/57元。

临床需求



检测能力

检测稳定性？

项目多，样品种类也多，累！累！累！

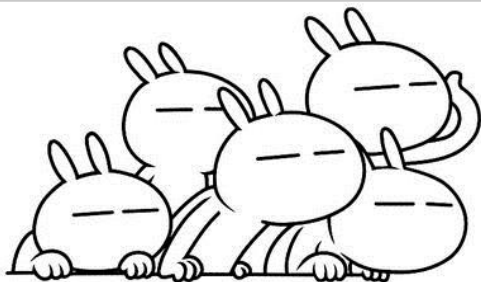
手工操作，烦！烦！烦！

漏检？误诊？污染了？

和我昨天做的结果对不上！

和其他医院做的结果对不上！

和免疫生化结果对不上！



PCR

全自动核酸提取检测工作站 实验流程

样本准备



核酸提取



PCR 试剂加样



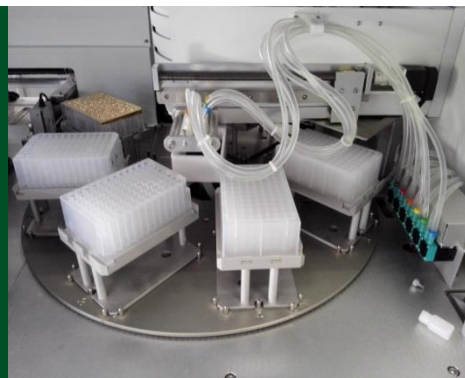
扩增





移液工作站

- 原始管上机
- 自动试管条码扫描



磁分离仪

- 96/24道2种规格提取头可更换
- 独立4通道移液器，具液面探测功能

移液工作站台面

- 12个标准板位
- 16根试管载架



磁分离仪台面

- 360度旋转式台面
- 8个标准板位



全自动核酸提取工作站



QIAasymphony SP



M2000 SP



cobas AmpliPrep



Perkinelmer Pre-NAT



ANAS 1000



Autrax

OTHERS.....

方便、快速、稳定、防污染

Pre-NAT 平台三大优势：

❑ 原始管上机、1.5h-2h 可同时完成96个样本；

❑ 仪器、试剂性能稳定：

机械稳定性：进口硬件+软件+用户量+售后

试剂性能稳定可靠

❑ 防污染措施充分；

客户定制：如
剩余样本保存

与众不同之处：

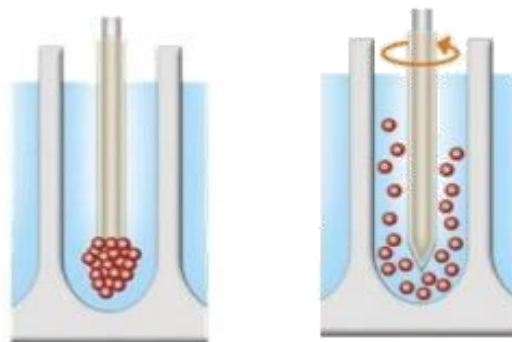
磁珠、试剂、仪器 三者能够系统化、一体化。

Pre-NAT四大技术特点

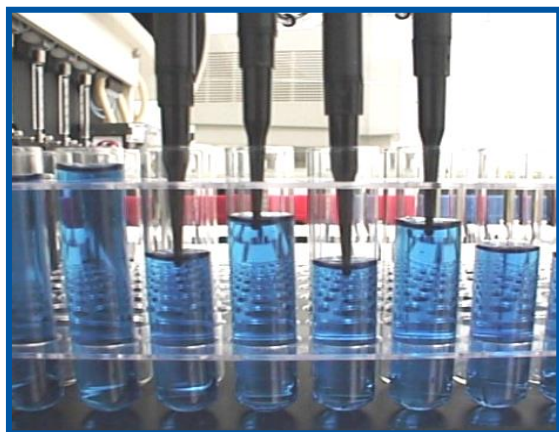
VersaTip（多功能加样器）专利



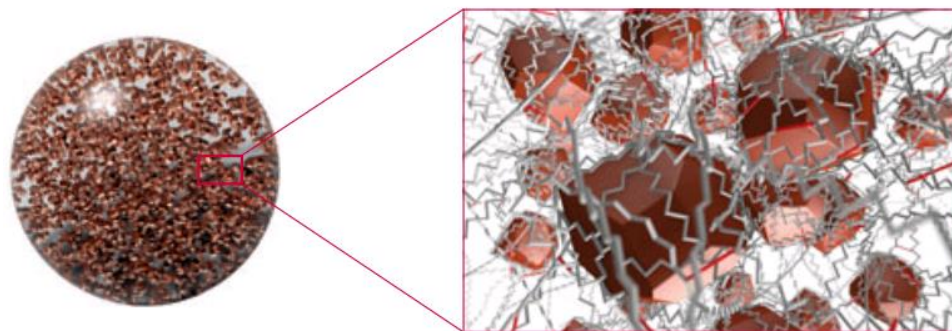
独家电磁场磁棒旋转混匀专利



独立液面感应功能



聚乙烯醇（M-PVA）专利磁珠

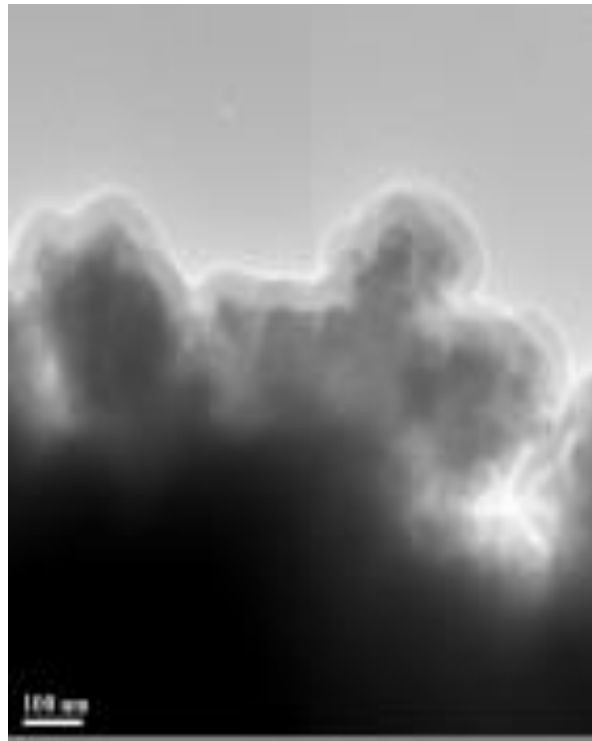


加样针间距可调，安全门设计，模块化设计等特点

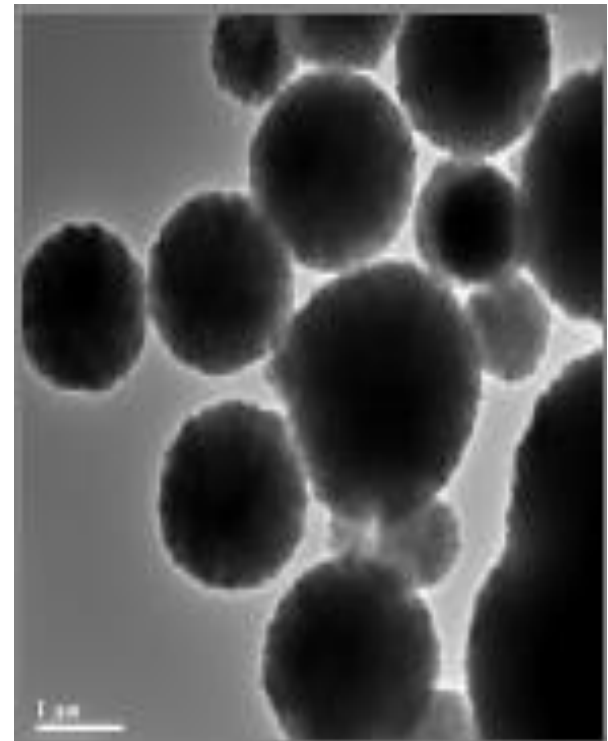
磁珠原料才筛选



某进口磁珠



某国产磁珠

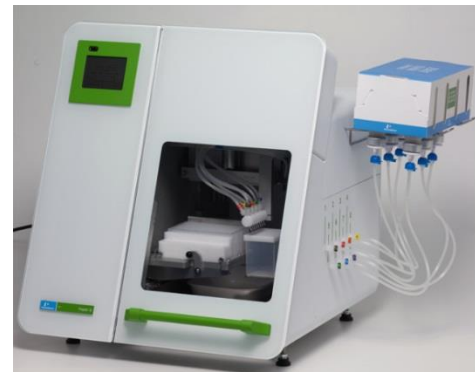


Perkinelmer磁珠

PKI分子诊断自动化解决方案



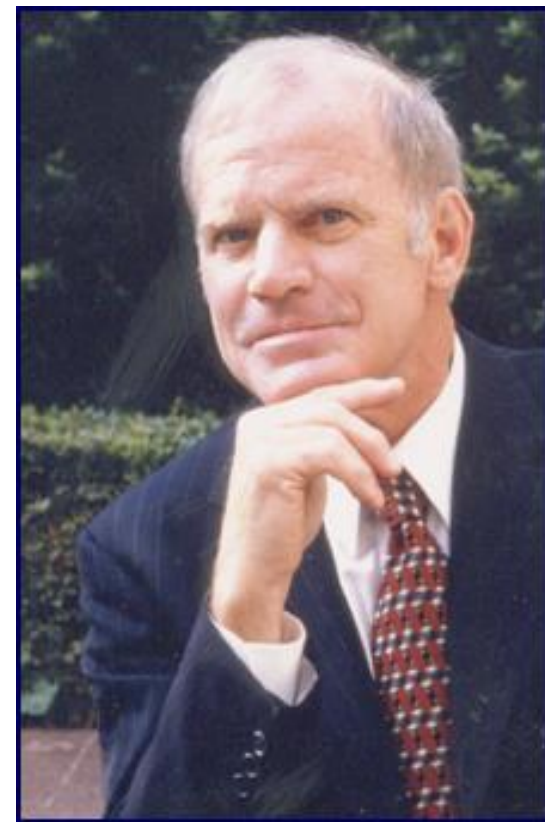
- 96样品，1.5h完成提取
- 样本体积，10ul-4ml
- 全自动，96/24头自由切换
- 原始管上机，条码扫描
- 包含PCR反应体系配置系统
- 向下兼容各种分子生物学检测方法
- 大量整合好的即用方案



- 全样本类型覆盖
- 支持多种样品体积
- 向下兼容各种分子生物学检测方法

(PCR: Polymerase Chain Reaction)

PCR是由美国PerkinElmer公司科学家穆利斯提出的一种体外简化条件下模拟DNA体内复制的DNA快速扩增的方法，此技术获得1993年诺贝尔化学奖。



Kary B. Mullis

**Newborn & Pre-Natal
Screening**
新生儿和产前筛查

Infectious Disease
传染性疾病

Applied Genomics
应用基因组

Drug Discovery
药物发现

Pre-Clinical
临床前研究

Diagnostics

Finding diseases sooner
for better outcomes

Diagnostics

Research

Life Science Research

Discovering better drugs
faster

PerkinElmer NGS样品制备全流程解决方案

核酸提取

核酸质控

文库制备

文库质控

测序

分析



自动化的
高得率、
高纯度
核酸提取



微升级OD检测
与杂质分析

自动化的
核酸完整性
分析与定量



自动化
文库构建
工作站系列
及试剂



自动化
文库质控
金标准



兼容二代与三代
Illumina、
LifeTech及
PacBio平台
全方位应用及试
剂支持

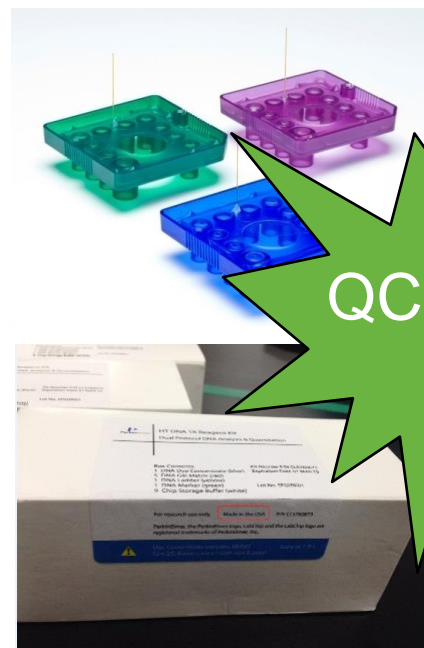
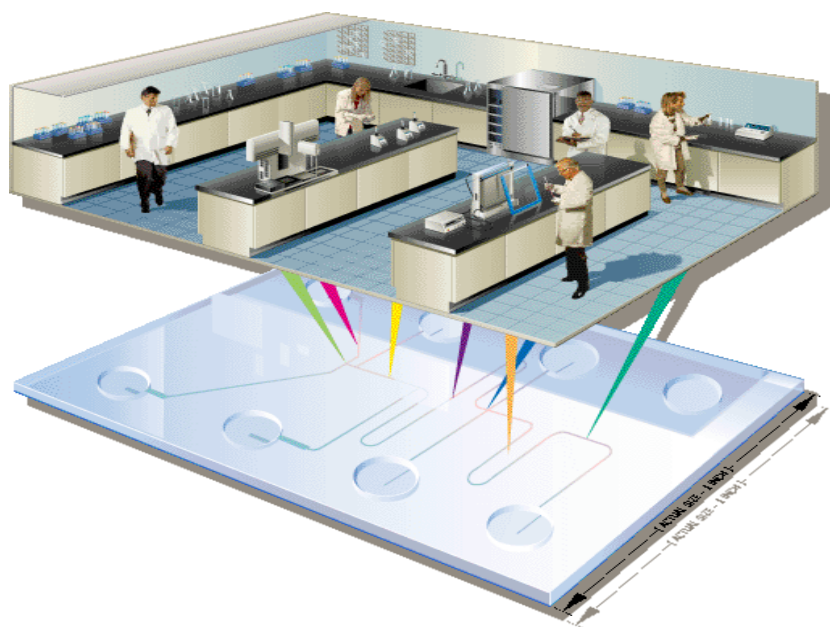


TIBCO
Spotfire® 数据
可视化
GeneSifter®
数据分析与
实验室数据管理

LabChip GX Touch系列：NGS样品质控金标准

微流控Lab-on-the-Chip技术：遗传分析样品质控金标准

LabChip GX Touch系列：2014年7月最新发布



QC金标准

芯片与试剂



LabChip GX
Touch HT



感谢聆听