

高敏肝炎病毒核酸自动化 检测新进展



圣湘生物
Sansure Biotech

您的健康 我的追求
Your health is my pursuit

WHO: 乙肝 (HBV) 和丙肝 (HCV) 防治依然严峻



HBV: 2.57亿

2015, WHO, HBV感染

有安全有效的疫苗防治乙肝病毒：
2015年出生的儿童中有**84%**接种了乙肝疫苗。

有能够治愈丙型肝炎和控制乙型肝炎的**药物**

全球：约有**3.25亿**人感染慢性HBV或HCV。

134万人因病毒性肝炎而死亡。

乙肝和丙肝引起的**肝癌死亡**约占**80%**。



HCV: 7100万

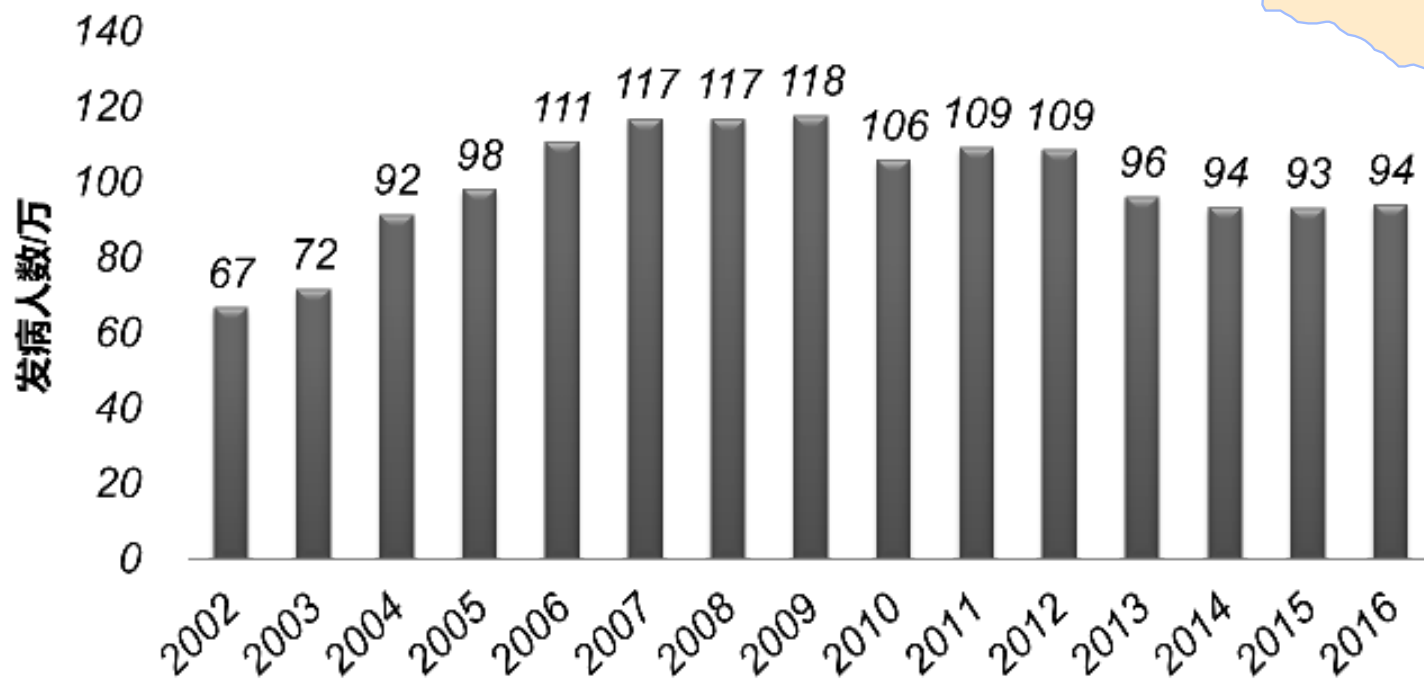
2015, WHO, HCV感染



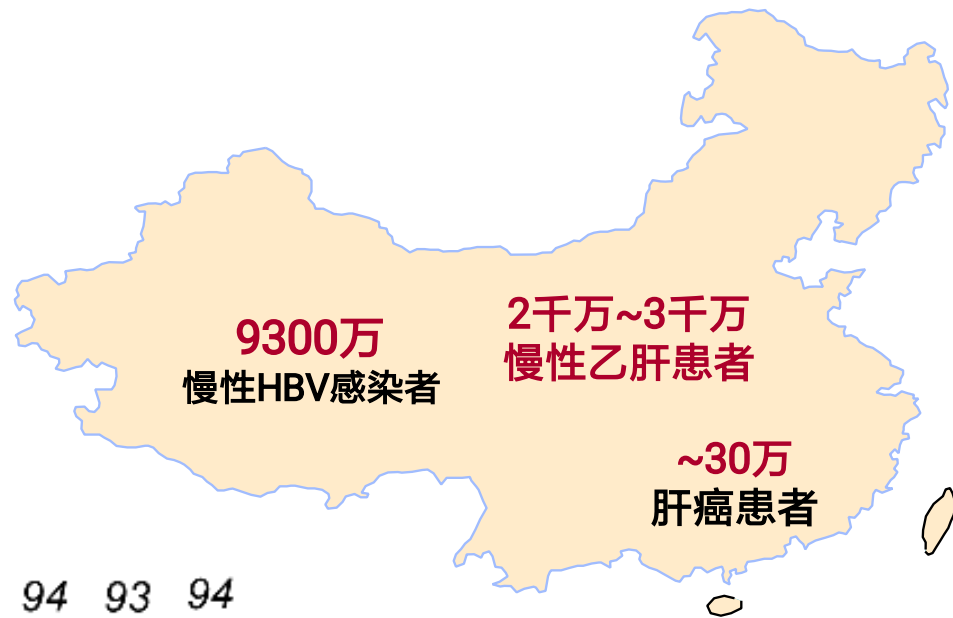
圣湘生物
Sansure Biotech

中国HBV感染人群依然庞大

HBV发病人数 (万人)



数据来源: CDC统计数据

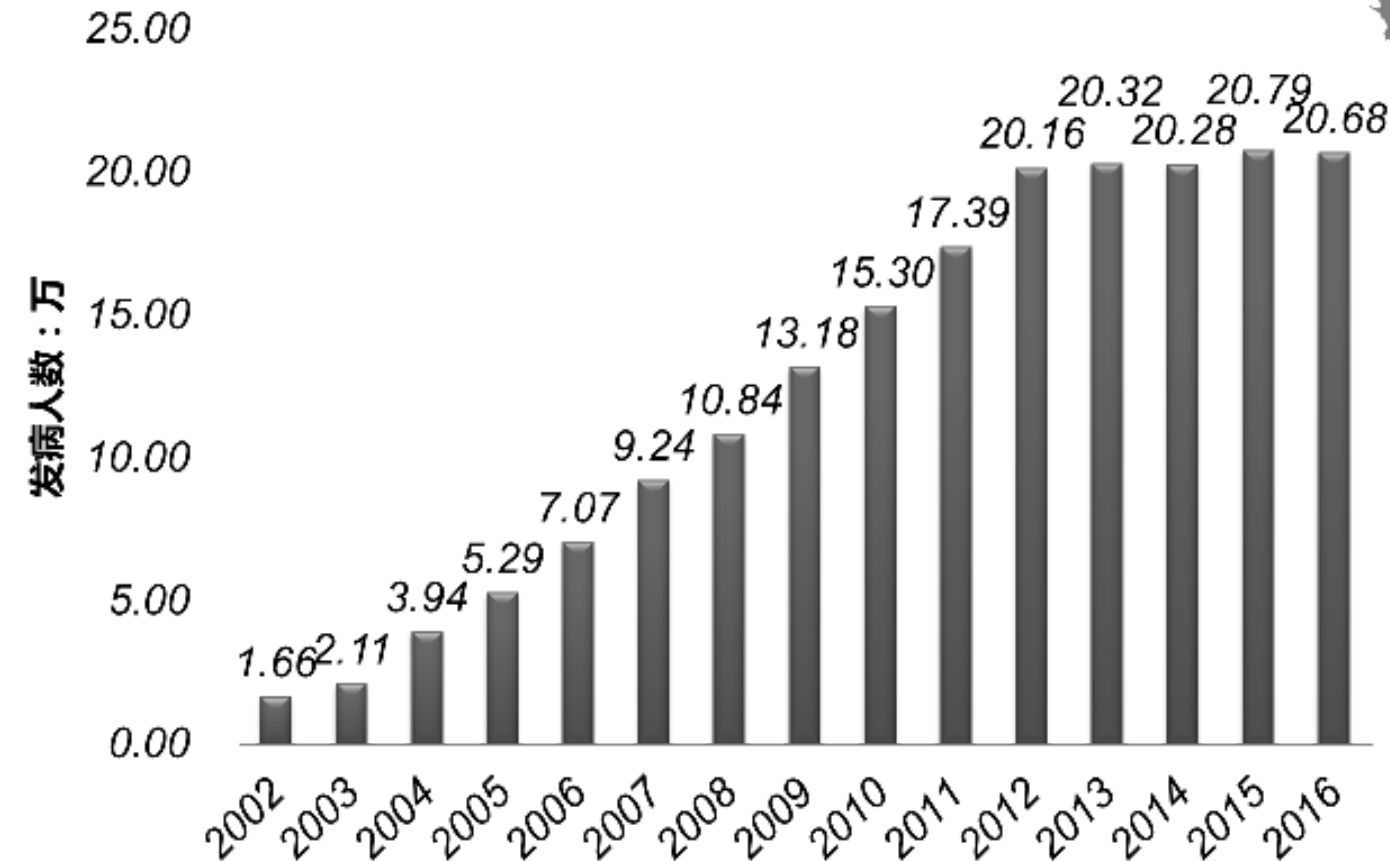


2006 年, 1~59岁人群血清HBsAg流行率

7.18%

中国HCV感染发展趋势快速：10年10倍

HCV发病人数（万人）



数据来源：CDC统计数据

我国HCV感染者超过
1000万例

一般人群HCV感染者约560万，加上
高危人群和高危地区的感染者。

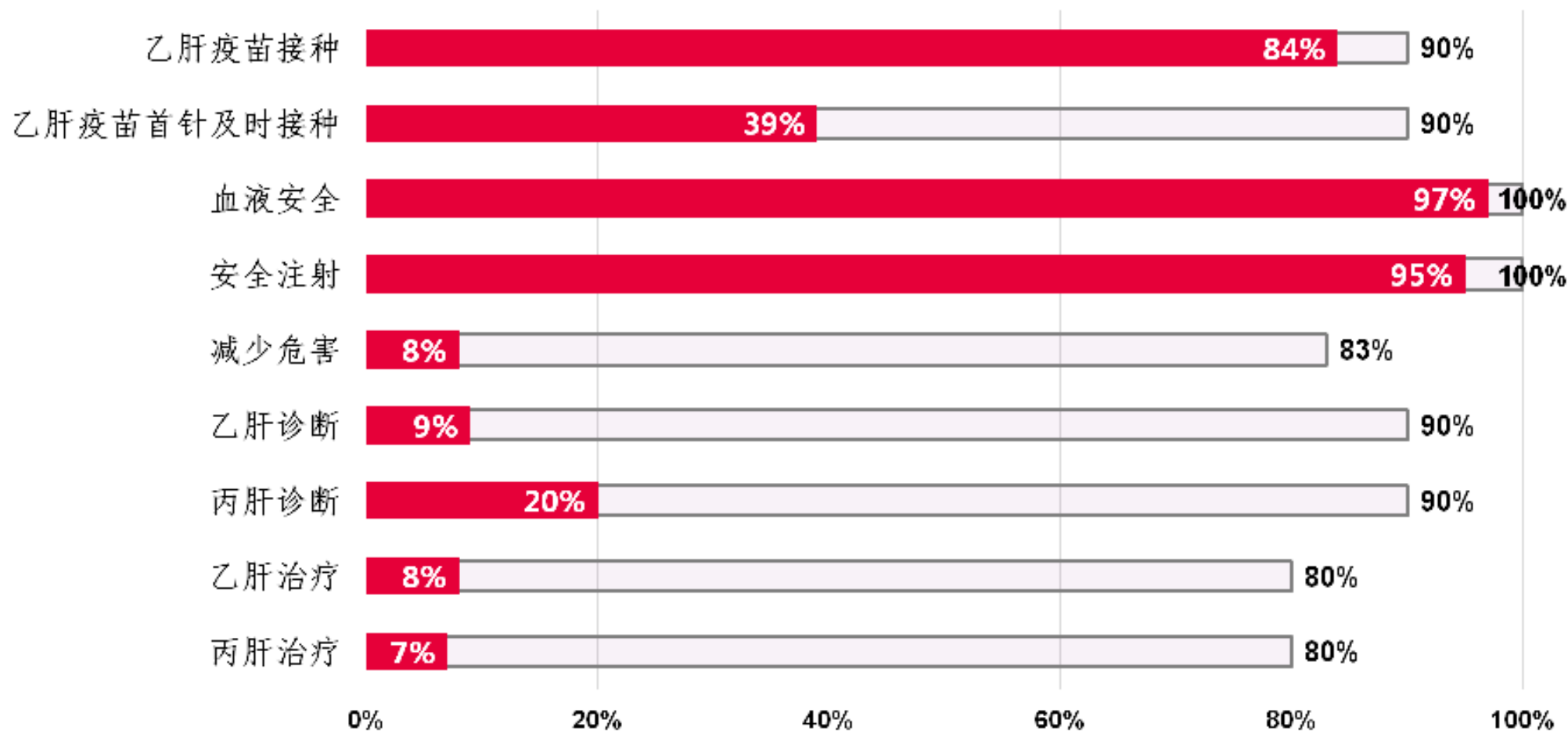
全球肝病防治领域的“一号课题”

2030目标：消灭肝炎危害

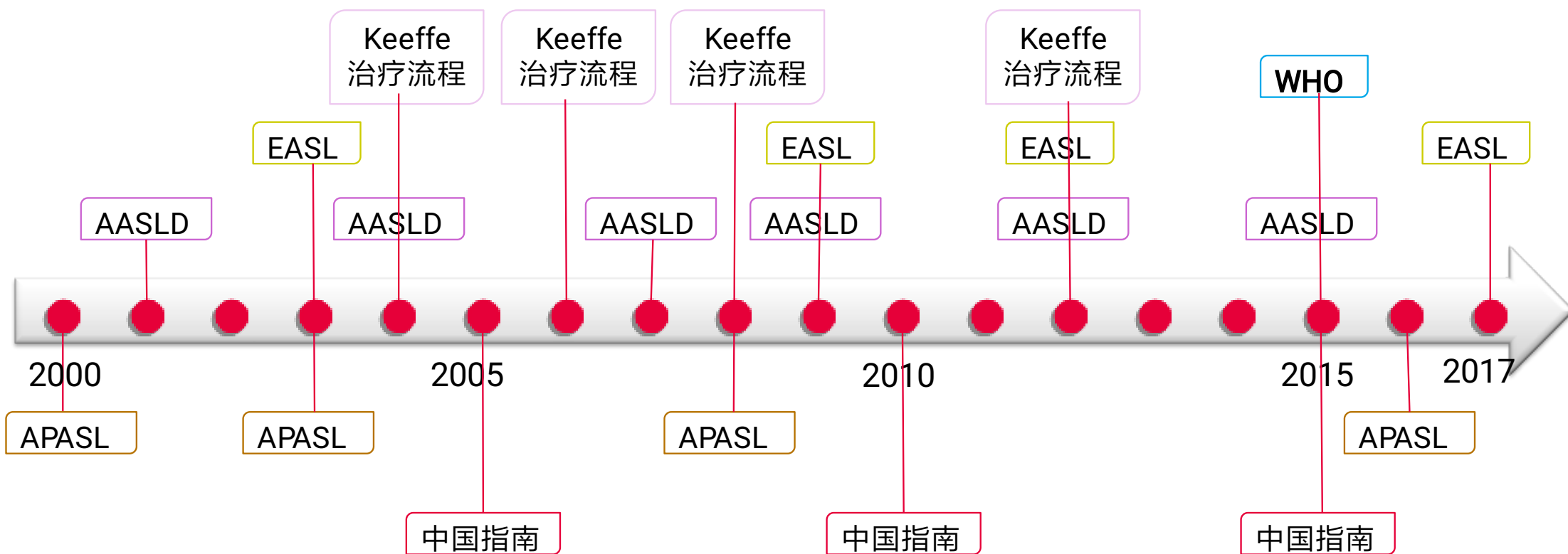
2016 年 5 月，世界卫生大会通过：《全球卫生领域病毒性肝炎战略（2016-2021）》

2017 年 2 月，WHO首次发布了《全球慢性病毒性乙型肝炎和丙型肝炎**检测指南**》

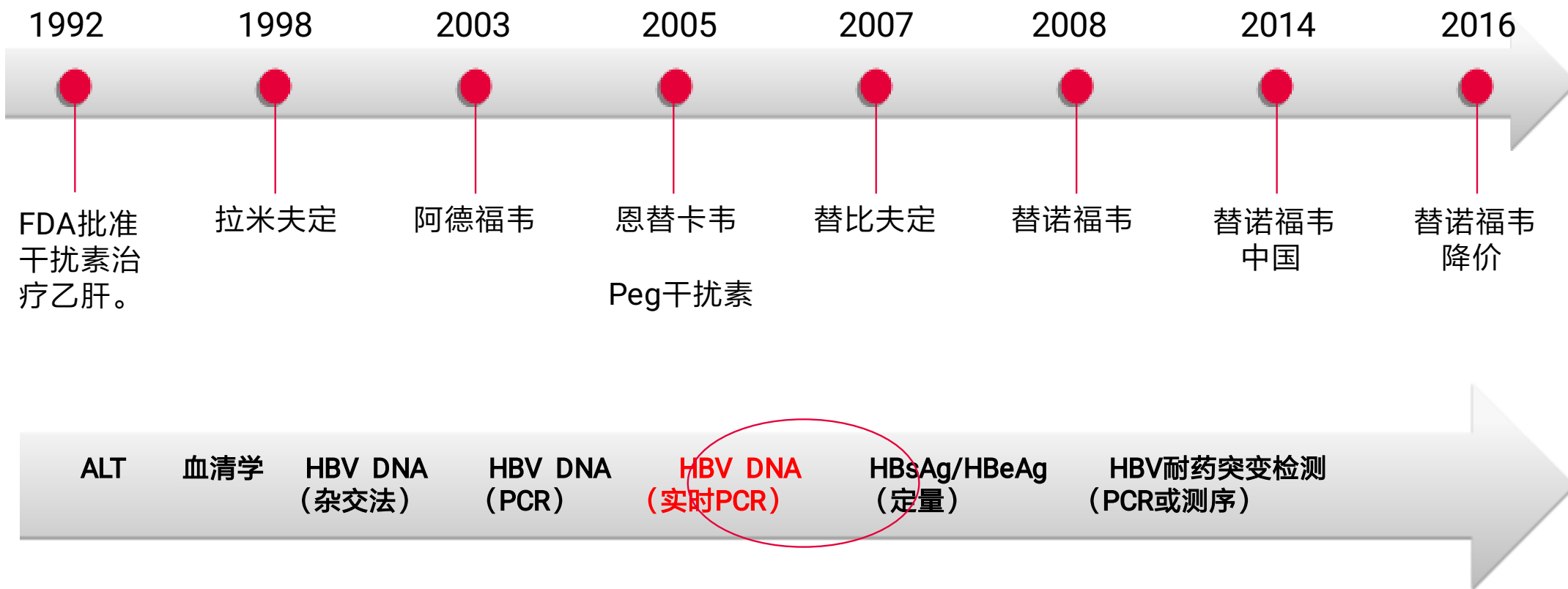
全球消除乙肝和丙肝策略：基线2015年与2030年目标



国内外CHB指南更新



抗乙肝病毒药物的不断涌现，实验室检测方法不断发展



治疗方案必须整合诊断、监测和治疗过程中的动态变化！

慢乙肝常用实验室诊断与监测指标

Markers of the virus

- **HBV DNA**
- **HBeAg**
- **HBsAg**
- **cccDNA**

Markers of liver damage

- **ALT**
- **AST**
- **Bilirubin**

Antibodies to the virus

- **Anti-HBc, Anti-HBc-IgM**
- **Anti-HBe**
- **Anti-HBs**

Severity of liver damage

- **Bilirubin**
- **Albumin**
- **Prothrombin time**

不同路标提供不同的诊断和治疗监控信息

	诊断、监测	启动治疗	鉴别 初始应答	预测 治疗应答	监测耐药	证明 持续应答
HBsAg						
HBsAg定量						
抗-HBs						
HBeAg						
抗-HBe						
抗-HBc						
HBV DNA						
ALT						

Modified from Pawlotsky et al. Gastroenterol 2008

1、CHB治疗效果评价

高精度的HBV DNA监测
更准确判断应答情况！



美国斯坦福大学医学中心Keefe教授（专家组）提供

CHB治疗效果评价

理想终点

- HBeAg阳性与HBeAg阴性患者，停药后获得持久的HBsAg消失，可伴或不伴HBsAg血清学转换

满意终点

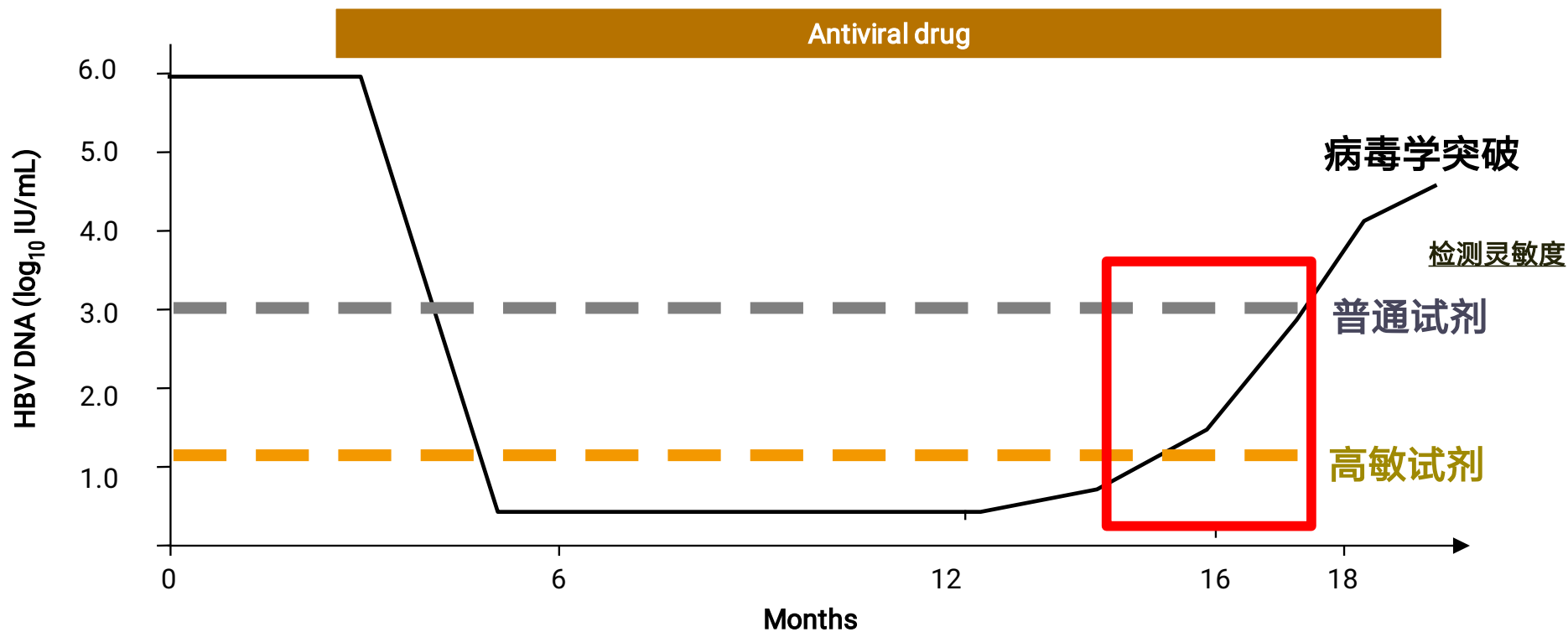
- HBeAg阳性患者，停药后获得持续的病毒学应答，ALT复常，并伴有HBeAg血清学转换；
- HBeAg阴性患者，停药后获得持续的病毒学应答和ALT复常

基本终点

- 如无法获得停药后持续应答，抗病毒治疗期间长期维持病毒学应答
(HBV DNA检测不到)

中国指南，EASL，APASL均有提出治疗终点。

2, 耐药监测和药物选择

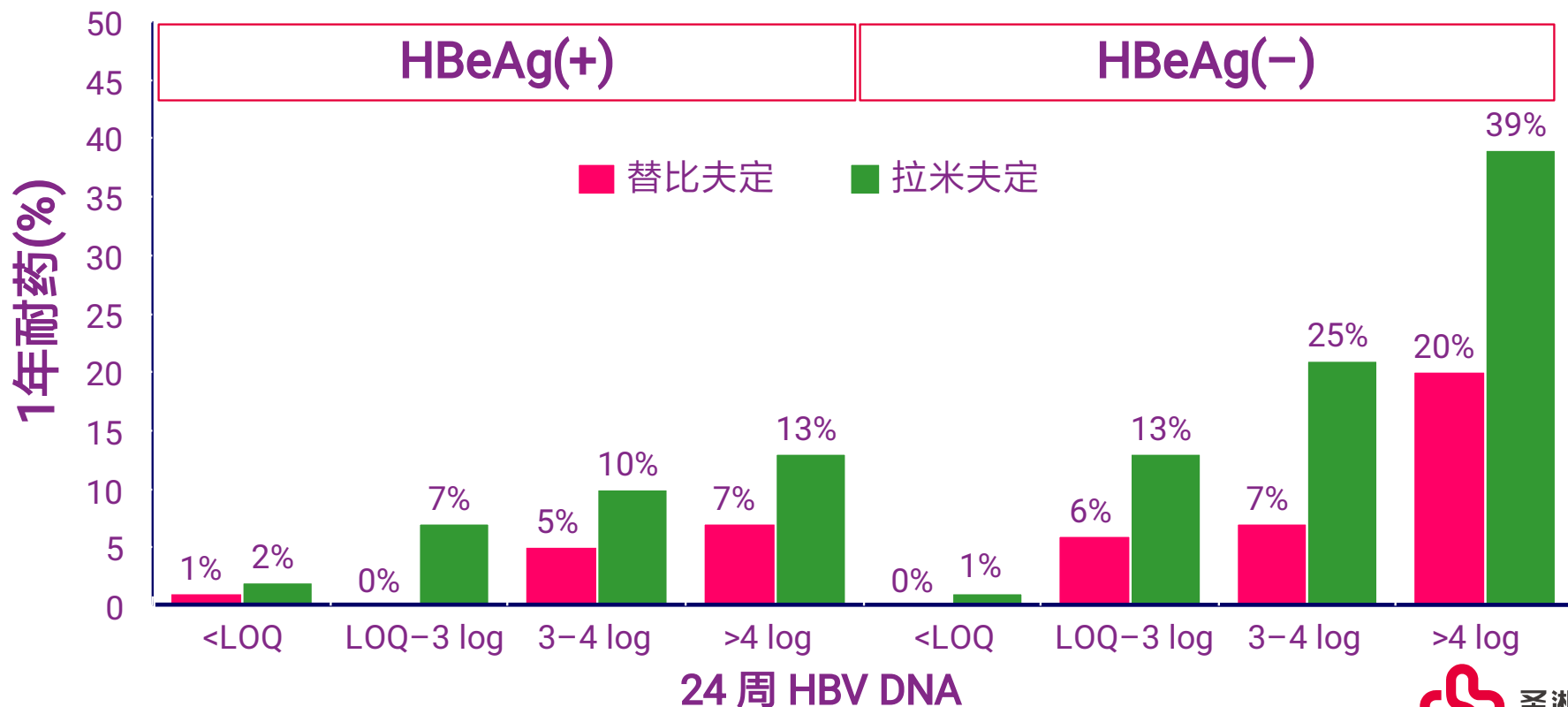


高精度的HBV DNA定量检测试剂，能更早发现
病毒学复发和病毒学突破！

耐药监测和药物选择

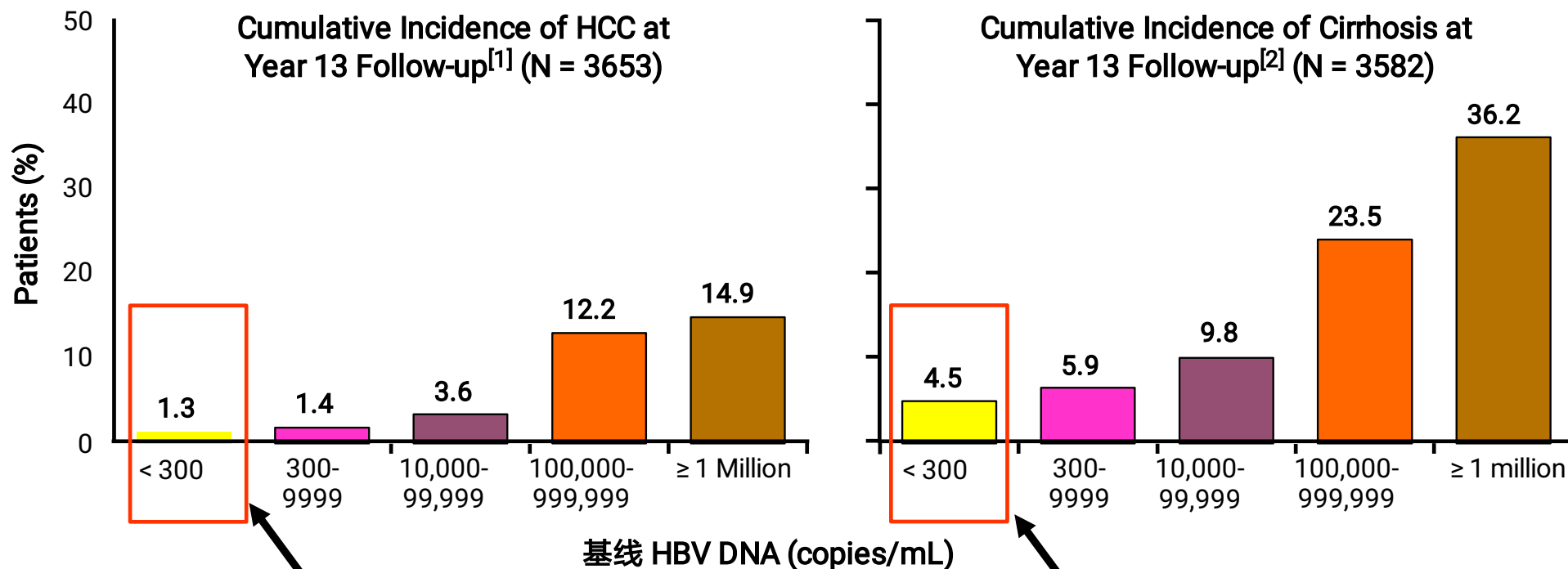
24周HBV DNA用于预测远期耐药发生率

GLOBE研究



Lai CL, et al. Hepatology 2005; 42(suppl 1):232A-233A (Abstract 92)

3, 准确的基线HBV DNA检测有助于肝癌和肝硬化风险评估



Risk of liver related complications is not eliminated with
HBV DNA suppression <60 IU/ml

1. Chen CJ, et al. *JAMA*. 2006;295:65-73.

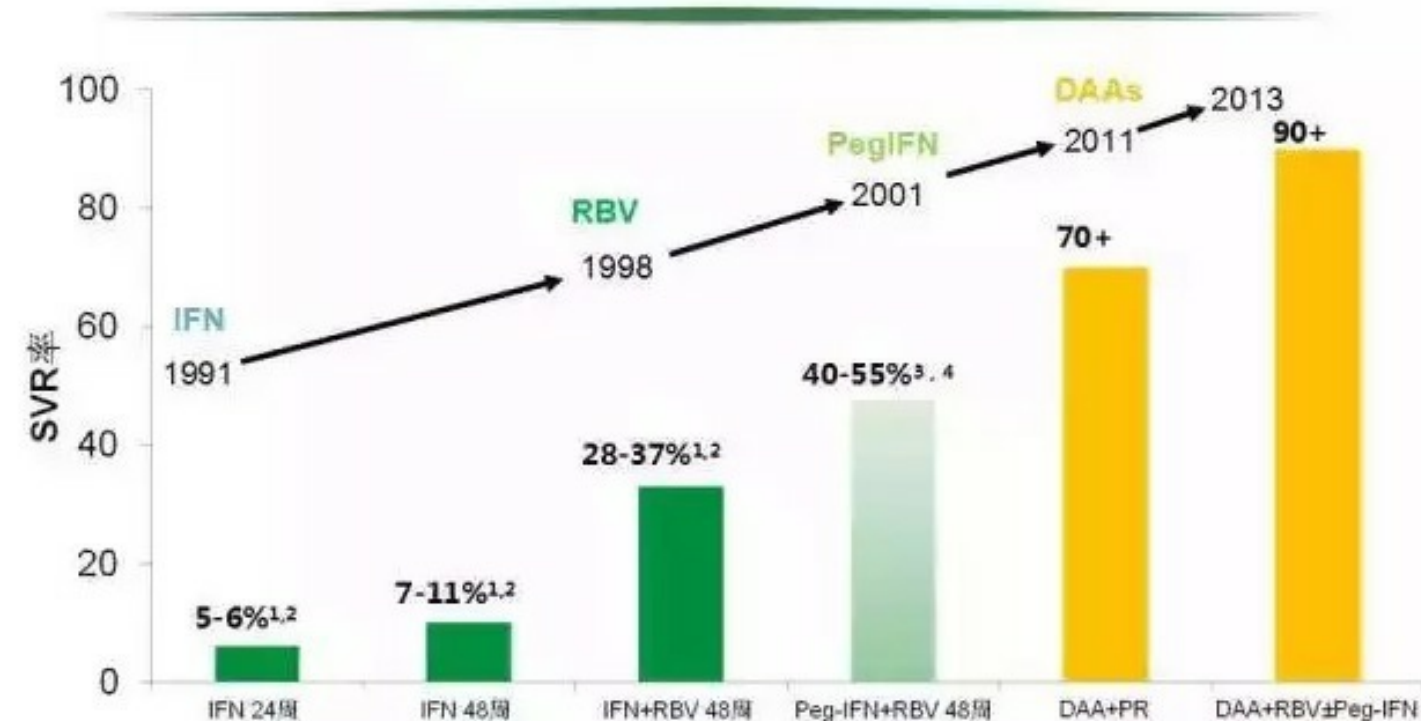
2. Illoeje UH, et al. *Gastroenterology*. 2006;130:678-686.

高敏PCR监测是走好长期抗病毒优化治疗之路的导航系统



丙肝药物不断发展，SRV率增高，治愈率越高

CHC治疗里程碑



- 常规推荐的治疗方案：PR方案（聚乙二醇干扰素α联合利巴韦林）
- 采用以干扰素为基础的方案进行治疗后的病毒应答率较低（44%~83%）⁵
- 2017.4.28，CFDA批准第一个DAA产品：盐酸达拉他韦片和阿舒瑞韦软胶囊联合治疗方案，用于治疗成人基因1b型CHC。

1. McHutchison et al. NEJM 1998;339:1485-92. 2. Ponard et al. Lancet. 1998 Oct 31;352(9138):1426-32
3. Sulkowski/McHutchison EASL 2008. 4. Poordad F et al. NEJM 2011. McHutchison JG NEJM 2009

5. Rao H, et al. J. Gastroenterol. Hepatol. 2014; 29: 545-553

精准检测是DAA时代抗HCV治疗的基石

方法	HCV诊断	治疗前评估	治疗期监测	治疗后随访
抗-HCV	√ 初诊	√		√
HCV RNA 定量检测	√ 确诊	√	√ ¹	√ ²
HCV 基因分型		√		
肝脏疾病的相关指标		√	√ ³	

1， 在治疗开始以及第4、12、24周采用监测血清HCV RNA水平，有助于监测疗效，并指导疗程决策。

2， 治疗24周结束后，采用监测血清HCV RNA水平，预防病毒学复发和突破。

HCV RNA定量检测的临床意义

—抗病毒治疗重要指征

病毒学反应		定义
RVR		治疗4周时, HCV RNA 转阴 (低于检测低限)
EVR	cEVR (完全EVR)	治疗4周时, HCV RNA 阳性 但12周时转阴 (低于检测低限)
	pEVR (部分EVR)	治疗12周时, HCV RNA 阳性 但相对于治疗前基线下降 $\geq 2 \log_{10}$
非EVR		治疗12周时, HCV RNA 下降 $< 2 \log_{10}$ 值
SVR		治疗结束后24周, 未检测到HCV RNA (低于检测低限)

RVR (快速病毒学应答)、EVR (早期病毒学应答)、SVR(持续性病毒学应答)



4, SFDA技术要求, 建议最低检测限不高于30IU/ml

国家食品药品监督管理总局 通告

2013年 第3号

关于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等4项指导原则的通告



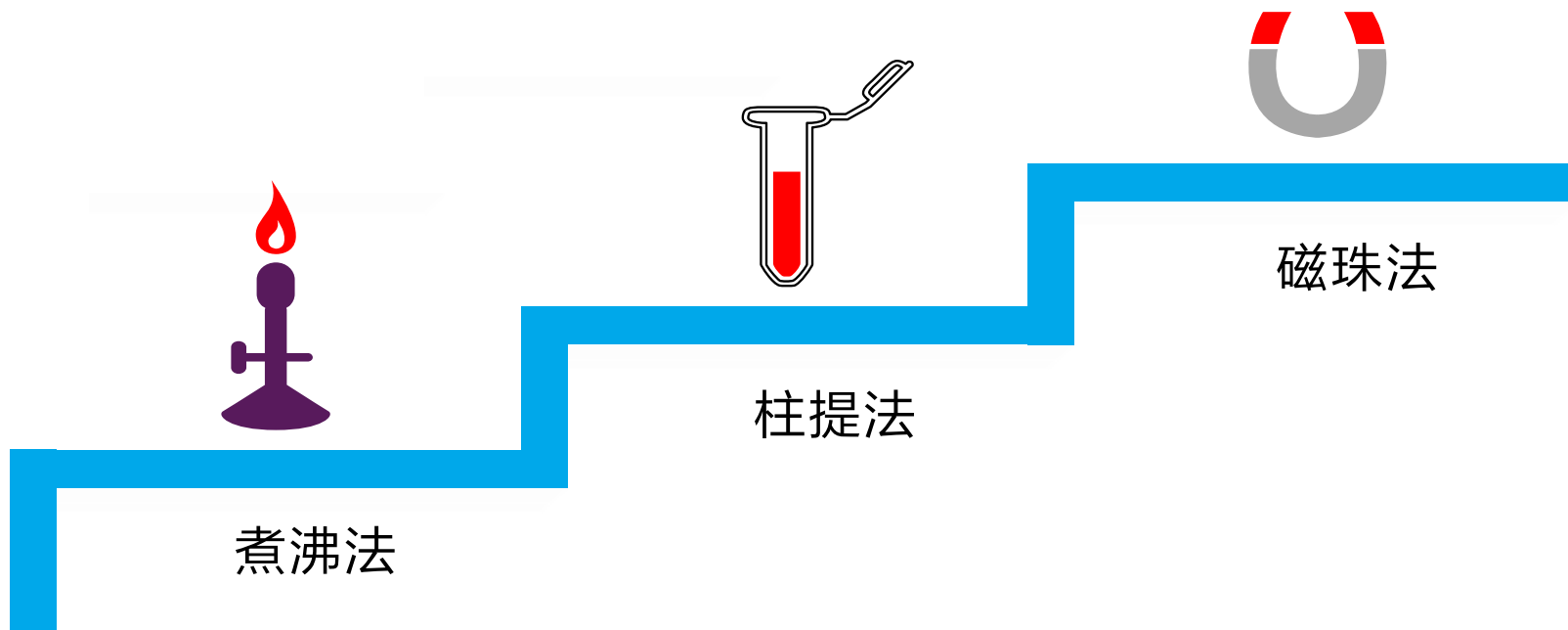
- 不建议采用煮沸法进行核酸提取
- HBV DNA最低检测限应 ≤ 30 IU/ml
- HCV RNA最低检测限应 ≤ 50 IU/ml
- 内标全程监控核酸提取和扩增

乙型肝炎病毒DNA定量/HCV RNA定量检测试剂注册申报资料技术指导原则

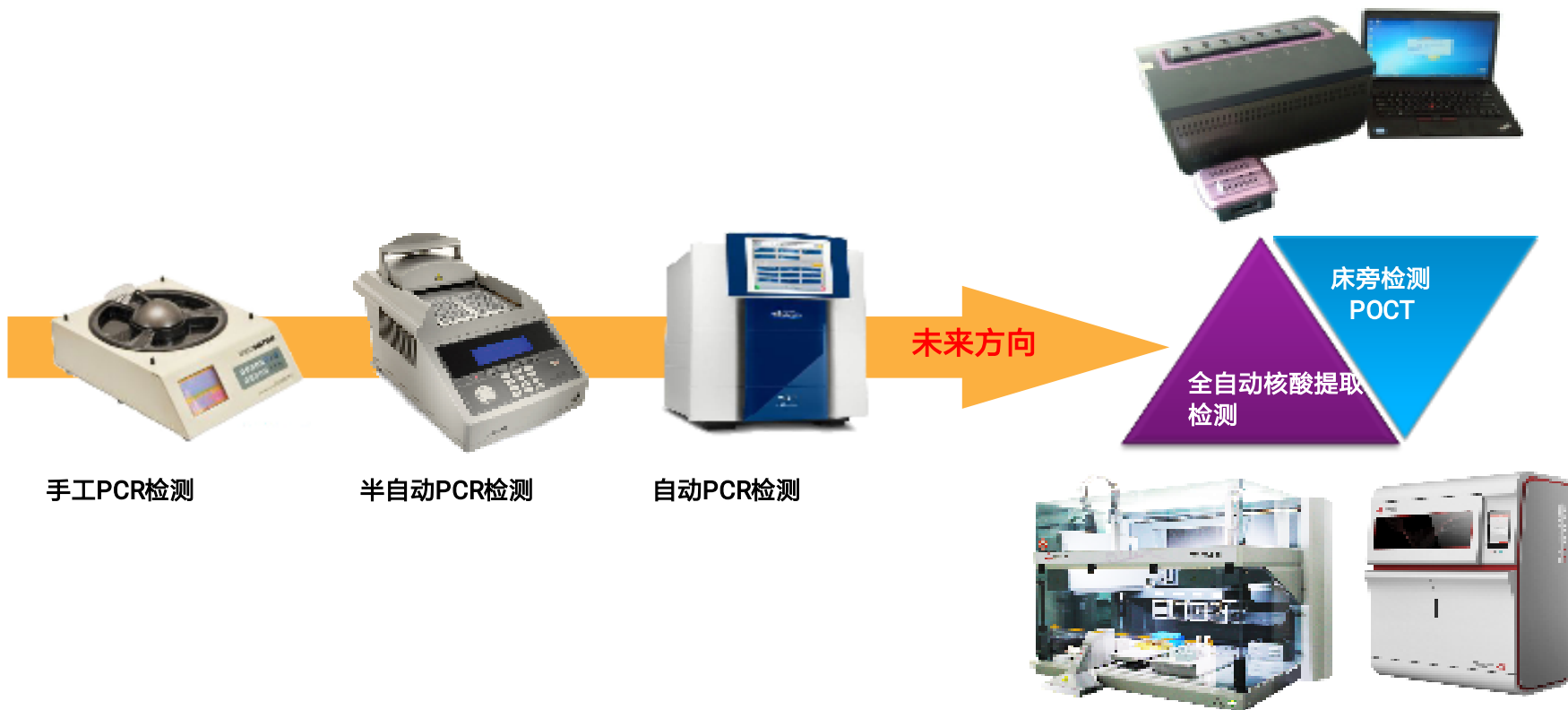
《医疗机构临床检验项目目录（2013年版）》

项目名称	备注
一. 临床体液、血液专业	
五. 临床分子生物学及细胞遗传学检验	
1. 感染性疾病分子生物学检验	
乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸扩增定性检测	
乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸扩增定量检测	
高敏乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测	
乙型肝炎病毒基因分型检测	
乙型肝炎病毒前C区变异检测	
乙型肝炎病毒（HBV）YMDD变异检测	
乙型肝炎病毒（HBV）核心区启动子（BCP）变异检测	
乙型肝炎病毒基因变异检测	
丙型肝炎病毒核糖核酸扩增定性检测	
丙型肝炎病毒核糖核酸扩增定量检测	
高敏丙型肝炎病毒核糖核酸定量检测	

方法学的变迁



检测过程的变迁



磁珠法技术平台

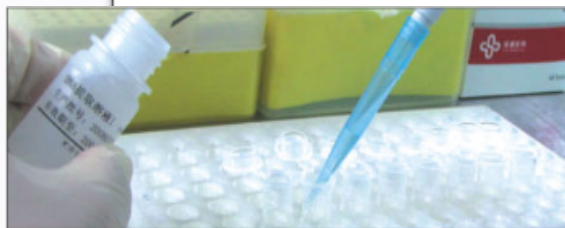


磁珠（电子显微镜）

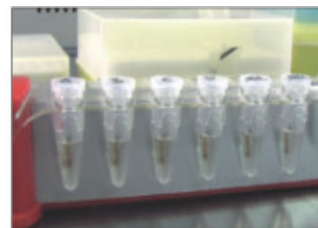
- 核-壳修饰技术：超顺磁性核心+分子聚合物外壳+官能集团。在特定环境下，特异吸附核酸。
- 超顺磁：磁珠置于磁场时，显示其磁性，离开磁场时，磁性消除，重新分散。

圣湘“磁珠法”技术平台特点

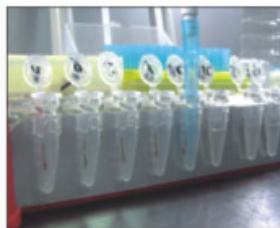
- 常温化学裂解，无需加热煮沸
- 核酸纯化仅需一次洗涤
- 核酸无需从磁珠上洗脱，带磁珠扩增
- 内标参与核酸提取及扩增，全程监控
- 磁珠侧壁吸附，去除废液更彻底、
- 可手工、可自动化，应用灵活
- 纳米磁珠，颗粒小，磁通量高，均匀悬浮，充分吸附
- 灵敏度高，比过去提高了50-100倍。如乙肝灵敏度10 IU/ml，
丙肝灵敏度25 IU/ml



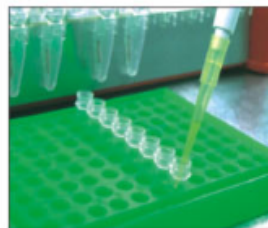
1、加样 (200 μl)



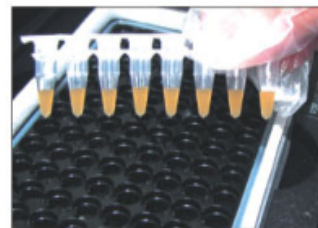
2、磁珠吸附



3、洗涤



4、磁珠DNA结合物点样



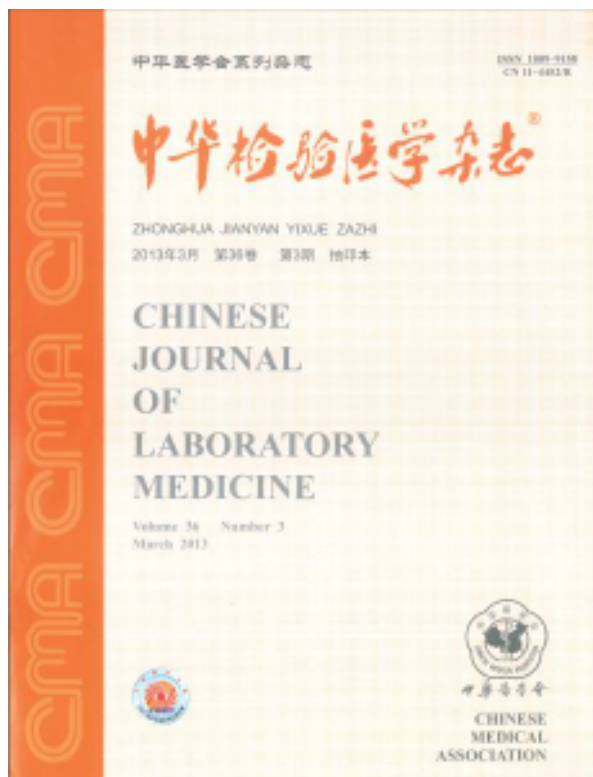
5、上机检测

多个中心对新技术进行了系统性评价

- 考评试剂：湖南圣湘公司的高敏感HBV DNA检测试剂
- 参比试剂：**罗氏 (COBAS 2.0)**
- 进行试剂的实验室质量评价，包括试剂的可溯源性、准确度、精密密度等考评

(北京大学感染病中心、北京佑安医院、中南大学湘雅医院、南方医院、中国医科大学附属盛京医院)

多个中心对新技术进行了系统性评价



· 280 ·

中华检验医学杂志 2013 年 3 月第 36 卷第 3 期 Chin J Lab Med, March 2013, Vol. 36, No. 3

· 试剂与仪器 ·

新型国产乙型肝炎病毒核酸定量 检测试剂的质量评价

沈波 龙露 邓中干 王杰 戴立志 陈德喜 谭建明 庄辉 曹斌民

的总符合率达 97.62% (41/42), 且显著相关 ($R^2 = 0.934, P < 0.0001$)。结论 新型定量试剂与 Roche 定量试剂在溯源性、符合率、精密度和血清盘评价中的差异无显著性, 该定量试剂有良好的检测质量, 可用于临床 HBV DNA 检测。(中华检验医学杂志, 2013, 36:280-285)



国家科学技术进步奖 证书

为表彰国家科学技术进步奖获得者，
特颁发此证书。

项目名称：慢性乙型肝炎诊疗体系的创新
及关键技术推广应用

奖励等级：二等

获奖者：湖南圣湘生物科技有限公司



证书号：2015-J-23302 2-01 D03

证书 Certificate

2016年中国体外诊断优秀创新产品奖 China Innovation Award of In-vitro Diagnostic Product 2016

为鼓励体外诊断技术创新发展，奖励广大科技人员，
本组委会特设中国体外诊断优秀创新产品奖，特予
表彰奖励。

This award is established to encourage technological innovation and promote in-vitro
diagnosis (IVD) technology development in China. In order to encourage
and promote the innovation and development in the in-vitro diagnostic field
in China.

产品名称：乙肝病毒核酸定量检测试剂盒(PCR荧光
探针法)

Product name: Hepatitis B Viral DNA Quantitative Fluorescence
Detection Kit (PCR Fluorescence Probing)

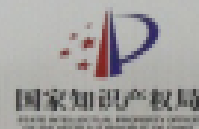
获奖者：湖南圣湘生物科技有限公司

Award winner: Sansure Biotech Inc.

二等奖 The Second Prize



CHINA IN-VITRO DIAGNOSTIC AWARDS (2016) (14-01)



中国专利优秀奖

名 称 乙肝病毒核酸定量检测试剂盒

专 利 号 ZL 201110046877.0

发 明 人 戴立志

专利权人 湖南圣湘生物科技有限公司

中 国

中华人民共和国
国家知识产权局

北京 2015 年 11 月



中国专利优秀奖

名 称 乙肝病毒核酸定量检测试剂盒

专 利 号 ZL 201110046877.0

发 明 人 戴立志

专利权人 湖南圣湘生物科技有限公司

中 国

中华人民共和国
国家知识产权局

北京 2017 年 12 月



国家知识产权优势企业

国家知识产权局
2016.12-2019.11



自动化核酸检测系统（进口平台）



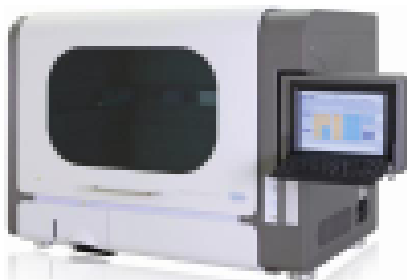
easyMag (BioMerieux)



m2000 sp(Abbott)



Cobas Ampliprep
(Roche)



MagNA Pure LC 2.0 System (Roche)



QIAAsymphony SP (QIAGEN)

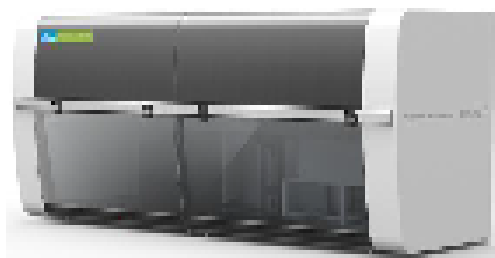


Natch S (圣湘)

自动化核酸检测系统（国产平台）



圣湘Natch CS



Pre-NAT



PANA9600

全自动核酸检测技术的关键问题

提取效率

无效率

原始样本管

零污染

提取速度

多项目兼容性

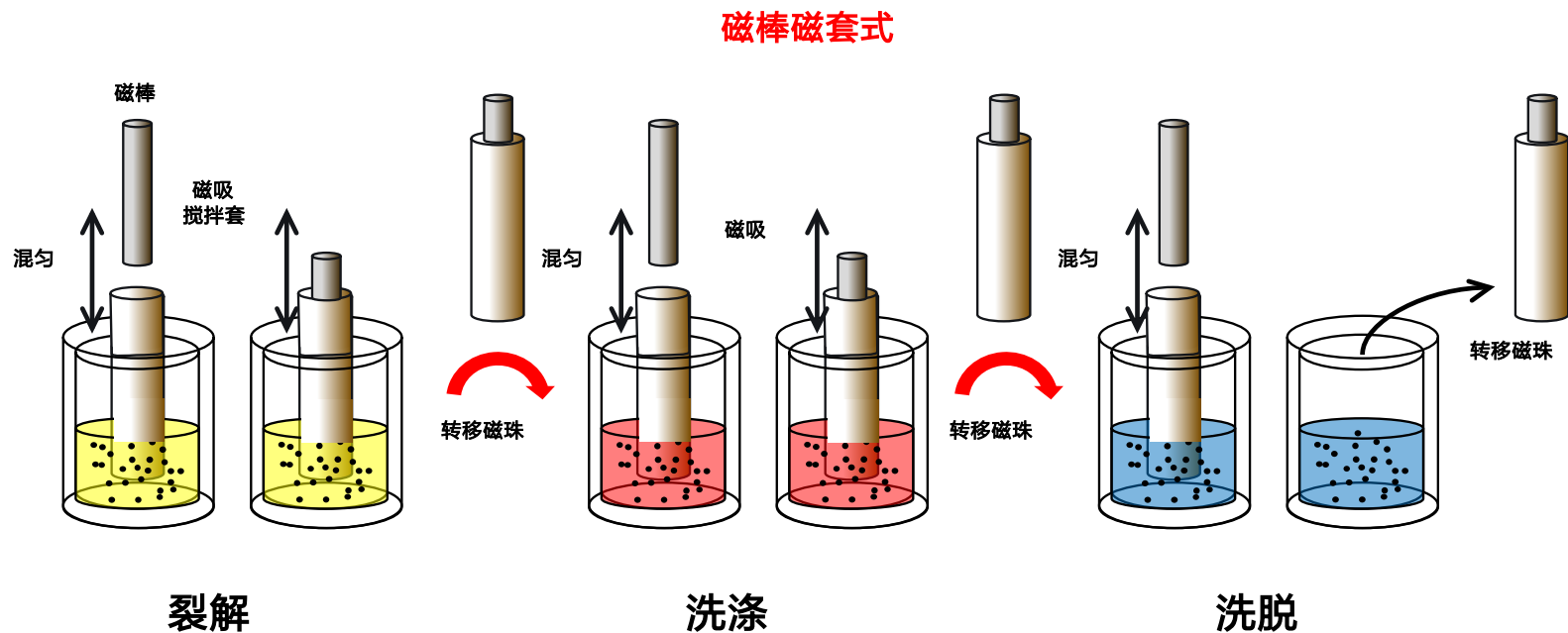
第一，在提取效率方面

不同核酸提取方法的比较

核酸提取方法		特点
	煮沸法	重复性差，提取效率差
	柱提法	过程繁琐，耗时长， 提取效率较高
	磁珠法	提取效率高，重复性好，抗干扰能力强
	自动化	灵敏度与手工方法相当，但使用简便、提取效率更高、自动化、高通量

第二，在无效率方面

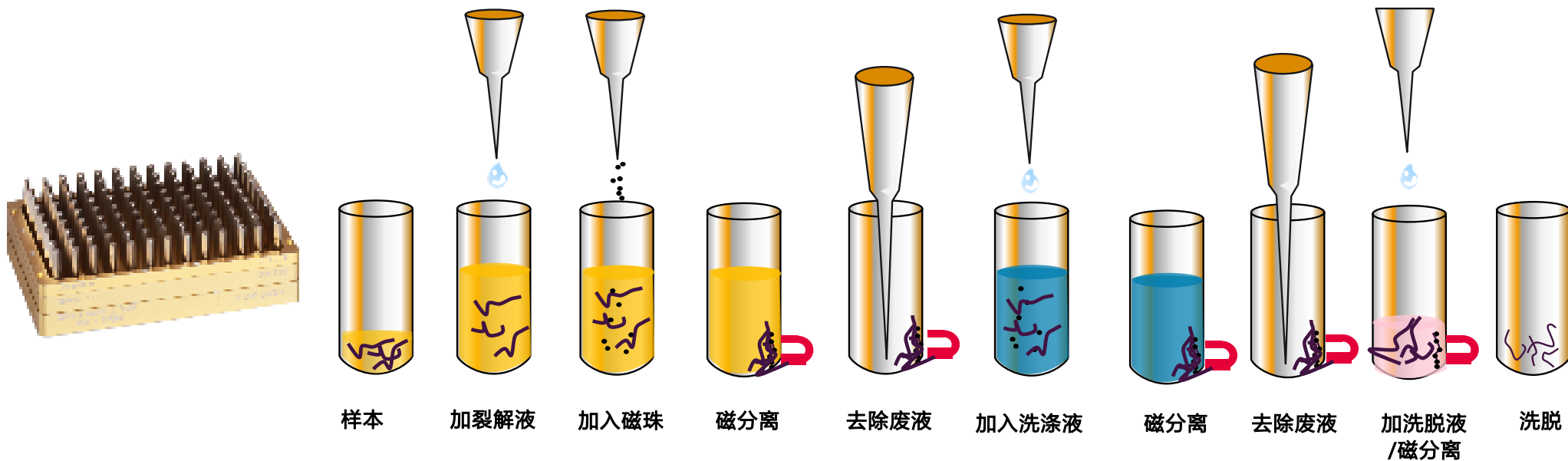
➤不同的磁珠吸附方式以及废液杂质去除的效果直接决定了实验的失败率和无效率。



在无效率方面

➤ **磁架式**的磁珠吸附方式，对于磁珠吸附得率，废液的去除效果等方面更佳。

磁架式

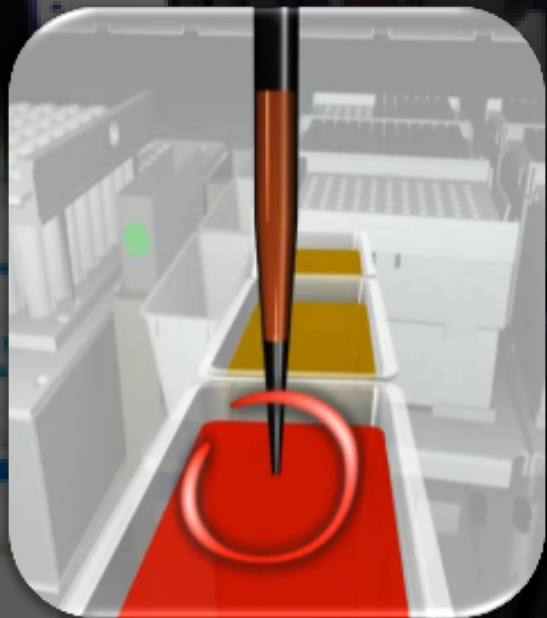


第三，在原始样本上机方面

- 原始样本管直接上机
- 样本需转移到仪器专用深孔板



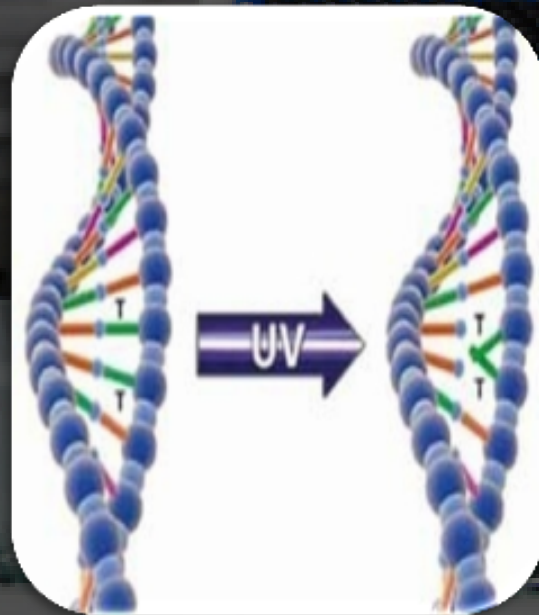
第四，全面预防污染



Air gap 防污



低位退吸头



UV紫外灯照射

第五，在提取速度方面

	Roche (COBAS AmpliPrep)	凯杰 (QIA Symphony SP)	PE (Pre-Net)	圣湘 (Natch CS)
移液通道	2通道 (样本) 2通道 (试剂)	4通道	8通道	4通道
一次性最大处理 通量	24	24	96	96
完成96个标本 检测耗时	6小时	4小时	3.5小时	3小时

第六，在多项目同时检测方面

传统分子实验室的繁琐工作流程

HBV
HCV
HEV
MP
Cp
FluA
RSV
HPV
EBV
HCMV
EGFR
K-RAS
BRAF
HER2
.....

不同厂家不同方法
不同项目不同样本
多人手工操作
.....

原始手工提取



分项目分方法
检测



肝炎类：HBV、HCV、HEV...

妇科肿瘤类：HPV

呼吸道类：MP、Cp、FluA、FluB、RSV...

STD类：CT、UU、NG、HSV-2...

肠道类：CA16、EV71、EV...

其他：EBV、HCMV、EGFR、K-RAS、BRAF、HER2、PI3K...

自动化、系统化的关键

样本处理 统一化

- 血清、血浆、外周血、生殖道分泌物、咽/肛拭子、宫颈脱落细胞、尿液、痰液等

核酸提取 自动化

- 使用同一试剂在同一提取仪上同时提取上述不同样本类型的核酸，并能同时完成多种不同的PCR体系的构建

检测程序 一致化

- 相同运行程序能满足上述的多种不同的PCR体系扩增要求

同一程序，同一试剂盒，同时提取不同样本类型的不同核酸！！！！

在多项目同时检测方面



Natch CS



统一提取试剂



能够实现实验室项目的全面拓展

90分钟完成 96T

血清
血浆
尿液
分泌物
宫颈脱落细胞

痰液
咽拭子
鼻咽拭子
全血
组织
...



PCR

基因
芯片

测序

肝炎类：HBV、HCV、HEV...

妇科肿瘤类：HPV...

呼吸道类：MP、CP、FluA、FluB、RSV...

STD类：CT、UU、NG、HSV-2...

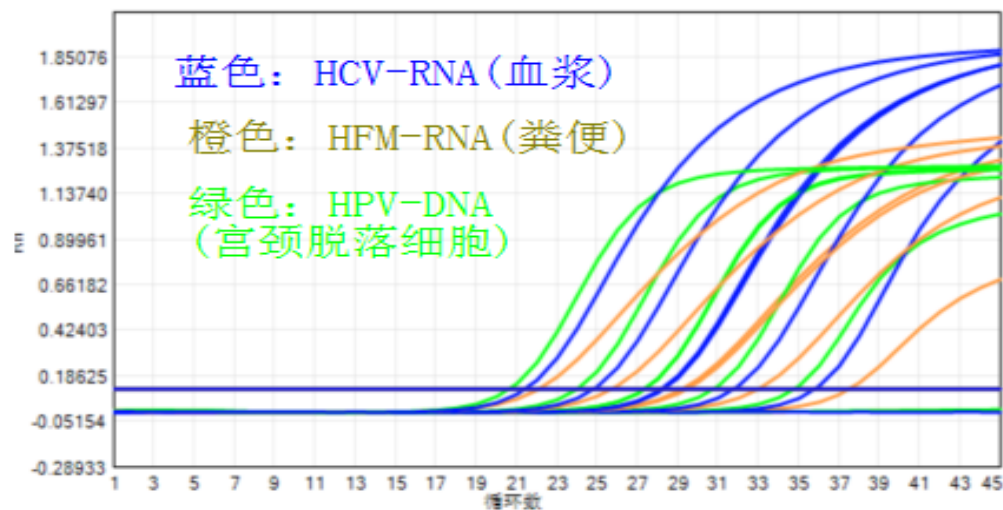
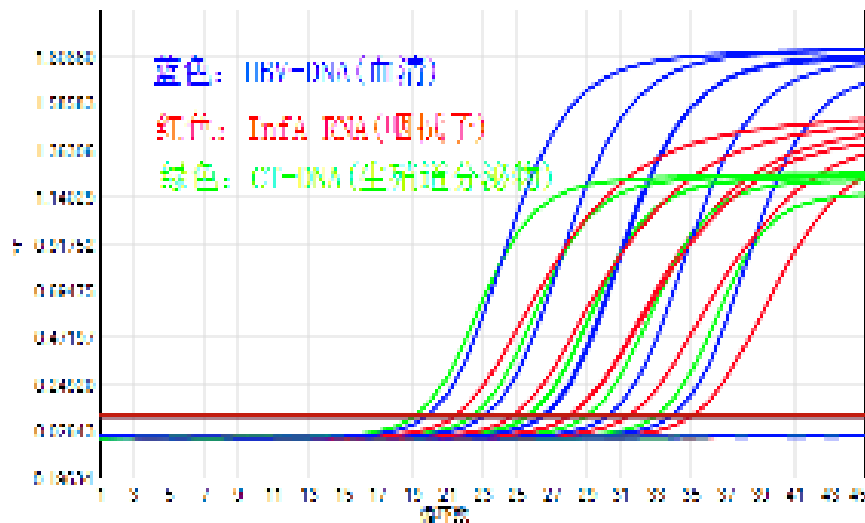
肠道类：CA16、EV71、EV...

其他：EBV、HCMV、EGFR、K-RAS、BRAF、
HER2、PI3K...

同一试剂
统一程序

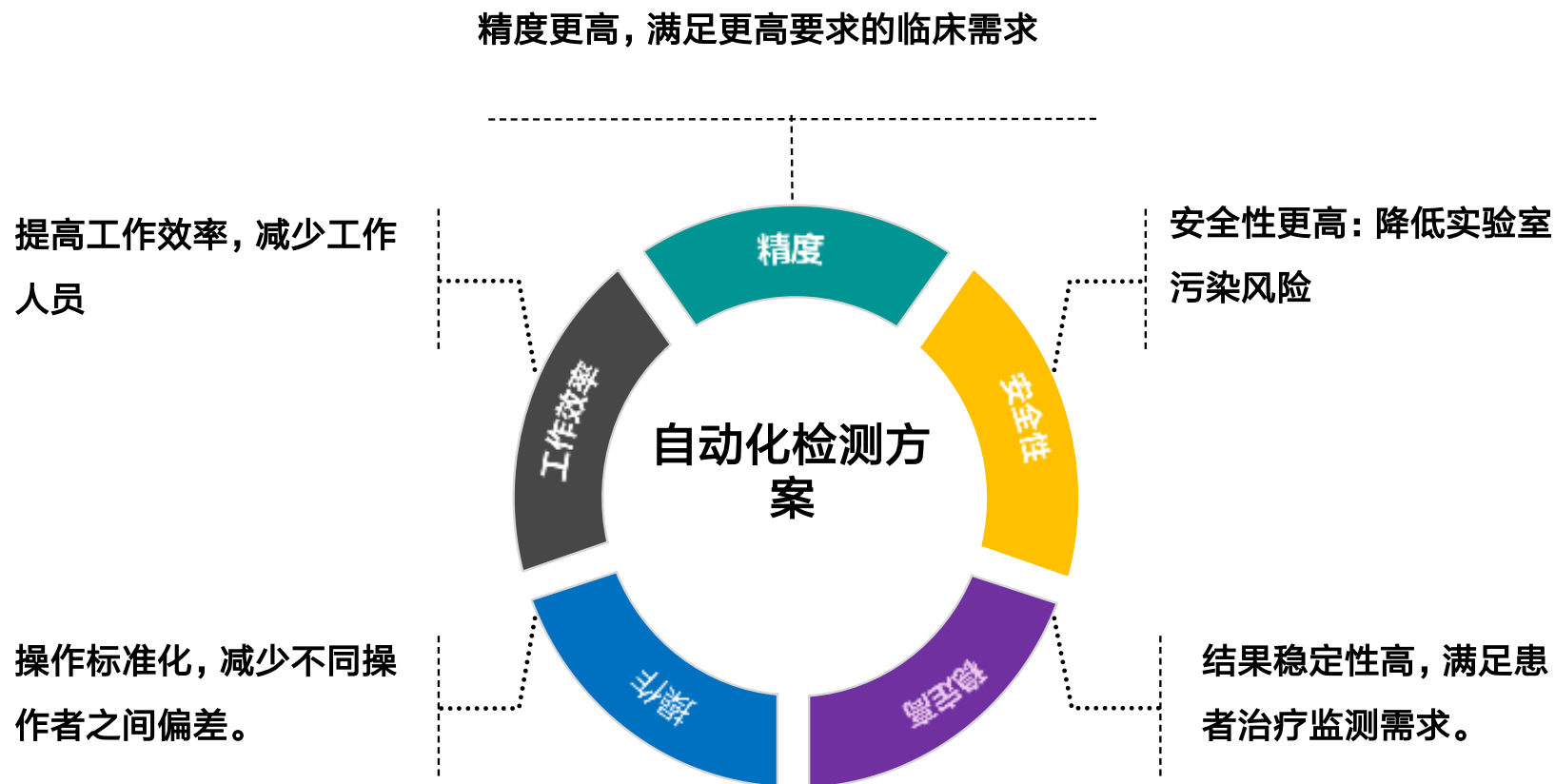
高效提取
分项目分方法检测

圣湘全自动分子诊断系统性能



从常见各种 (90%) 临床样本 (血清、血浆、全血、咽拭子、肛拭子、粪便、生殖道分泌物、脱落细胞、尿液、粪便、组织等) 中实现**同时统一**提取核酸，一次提取搭配各种扩增试剂，实现HBV、HCV、HIV-1、手足口、HPV、结核、流感、性病等几十种病原微生物的同时检测。

总结与展望



总结与展望

- 高敏检测为肝病临床诊疗提供重要的诊断依据，高敏检测将能够更好的服务大众健康。
- 自动化系统使高敏肝病检测的标准化、高精密度、高通量和简便化成为可能。
- 一些国产分子诊断自动化检测系统得到了快速的发展，其应用和效果需要在临床诊疗中进一步观察和拓展。



Thanks



圣湘生物
Sansure Biotech

www.sansure.com.cn