

上海星耀医学科技发展有限公司

乙型肝炎病毒核酸定量高敏检测的临床
应用价值

市场部 顾佳敏

国内慢性乙型肝炎的流行现状



- 什么是HBV DNA高敏检测？
- 如何去量化这个概念？
- 它的依据来自于哪里？
- 普通的检测方法为何无法满足临床需求？
- 等。。。。。

国内外指南对HBV-DNA检测灵敏度的 建议及要求

治疗过程中的疗效评价

HBeAg阴性或阳性CHB患者的临床药物治疗研究

PegIFN-a干扰素的治疗及预测

- PegIFN-a干扰素治疗-治疗48周后停药随访第24周时，HBV DNA < 2000 IU/ml，治疗有效。
- PegIFN-a干扰素与Nas联合或序贯治疗-ETV单药治疗9~36个月并且达到HBV DNA < 60 IU/ml，推荐使用PegIFN-a干扰素序贯治疗。
- HBeAg阳性患者接受Nas治疗1~3年后达到HBV DNA < 200 IU/ml再接受PegIFN-a干扰素治疗可提高HBsAg的清除率及转换率

我国《慢性乙型肝炎防治指南》（2015年版）

NAs药物治疗研究

- ETV治疗-治疗48周时，HBeAg阳性CHB患者中，HBV DNA转阴（ $<60\text{ IU/ml}$ ）为67%、HBeAg转换率为21%、ALT复常率为68%、肝组织学改善率为72%。HBeAg阴性CHB患者中，HBV DNA转阴（ $<60\text{ IU/ml}$ ）为90%、ALT复常率为78%、肝组织学改善率为70%
- TDF治疗-48周HBV DNA转阴（ $<80\text{ IU/ml}$ ）
- Ldt治疗-HBV DNA $<60\text{ IU/ml}$
- ADV治疗-HBV DNA $<200\text{ IU/ml}$

我国《慢性乙型肝炎防治指南》（2015年版）

NAs治疗中预测疗效和优化治疗

- 首选高耐药屏障的药物（ETV、TDF）
- 如选用低耐药屏障的药物（LdT），治疗早期应答情况良好（24周HBV DNA < 60 IU/ml）可继续单药治疗，应答不佳则加用ADV优化治疗，2年HBV DNA < 60 IU/ml者为71.1%

我国《慢性乙型肝炎防治指南》（2015年版）

PRACTICE GUIDELINE

AASLD Guidelines for Treatment of Chronic Hepatitis B

Table 5. Efficacy of Approved Preferred Antiviral Therapies in Adults With Treatment-Naïve CHB and Immune Active Disease (Not Head-to-Head Comparisons)

	Peg-IFN* (%)	Entecavir† (%)	Tenofovir‡ (%)
HBeAg-Positive			
HBV DNA suppression [‡]	30-42 (<2,000-40,000 IU/mL) 8-14 (<80 IU/mL)	61 (<50-60 IU/mL)	76 (<60 IU/mL)
HBeAg loss	32-36	22-25	—
HBeAg seroconversion	29-36	21-22	21
Normalization ALT	34-52	68-81	68
HBsAg loss	2-7 (6 mos post-treatment) 11 (at 3 yrs post-treatment)	2-3 (1 yr) 4-5 (2 yrs)	3 (1 yr) 8 (3 yrs)
(References)	31,33-35	36-38	30,39
HBeAg-Negative			
HBV DNA suppression [§]	43 (<4,000 IU/mL) 19 (<80 IU/mL)	90-91	93
Normalization ALT	59	78-88	76
HBsAg loss (%)	4 (6 mos post-treatment) 6 (at 3 yrs post-treatment)	0-1 (1 yr)	0 (1 yr)
(References)	40,41	42	39

*Assessed 6 months after completion of 12 months of therapy.

†Assessed after 2-3 years of continuous therapy.

‡HBV DNA <2,000-40,000 IU/mL for Peg-IFN; <60 IU/mL for entecavir and tenofovir.

§HBV DNA <20,000 IU/mL for Peg-IFN; <60 IU/mL for entecavir and tenofovir.

||ALT normalization defined by laboratory normal.

国内外大多数指南对于CHB患者抗病毒
治疗药物的临床研究都以 $<60\text{ IU/ml}$ 作
为HBV DNA的转阴标准

Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update

normal) and prolonged prothrombin time (prolonged by more than 3 s), or occurrence of complications such as ascites and hepatic encephalopathy [24].

12. *Undetectable serum HBV DNA* is defined as a serum HBV DNA level below the detection limit (<12 IU/ml) of a sensitive validated quantitative PCR-based assay.

Terminologies related to natural history of chronic HBV infection

Please refer to the section on natural history below.

Terminologies related to response to antiviral therapy

Responses can be divided into biochemical, serological, virological and histological responses. All responses can be estimated at several time points during and after therapy. The definitions of virological responses vary according to the timing (on or after therapy) and type of therapy. Two different types of drugs can be used in the treatment of CHB: immune modulators such as conventional or

pegylated interferon alpha (IFN or PEG-IFN), and antiviral agents such as nucleoside/nucleotide analogues (Table 3).

Biochemical response (B) Biochemical response is defined as normalization of ALT levels. It can be evaluated at several time points during therapy, and at the end and after the end of therapy. Since ALT activity often fluctuates over time, a minimum follow-up of at least 1 year post-treatment with ALT determinations at least every 3 months is required to confirm sustained off-treatment biochemical response. The rates of sustained off-treatment biochemical responses may sometimes be difficult to evaluate, as transient (usually <3 months duration) ALT elevations before long-term biochemical remission may occur in some CHB patients within the first year after treatment discontinuation. In such cases, additional close ALT follow-up of at least 2 years after ALT elevation seems to be reasonable in order to confirm sustained off-therapy biochemical remission [25]. However, biochemical responses may not correlate with DNA responses.

Serological response for HBeAg Serological response for HBeAg applies only to patients with HBeAg-positive CHB

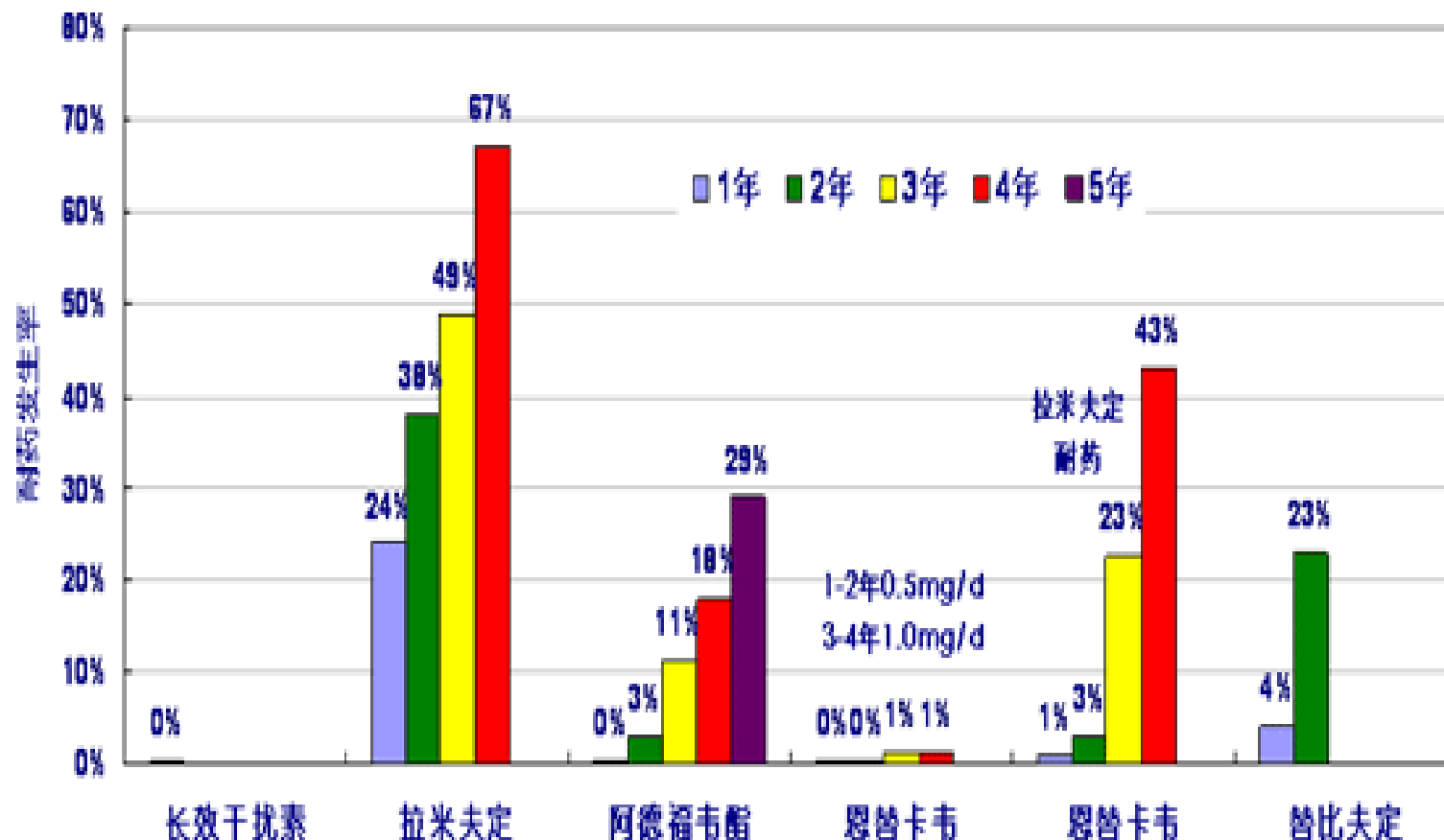
Keefe慢性乙肝治疗流程图



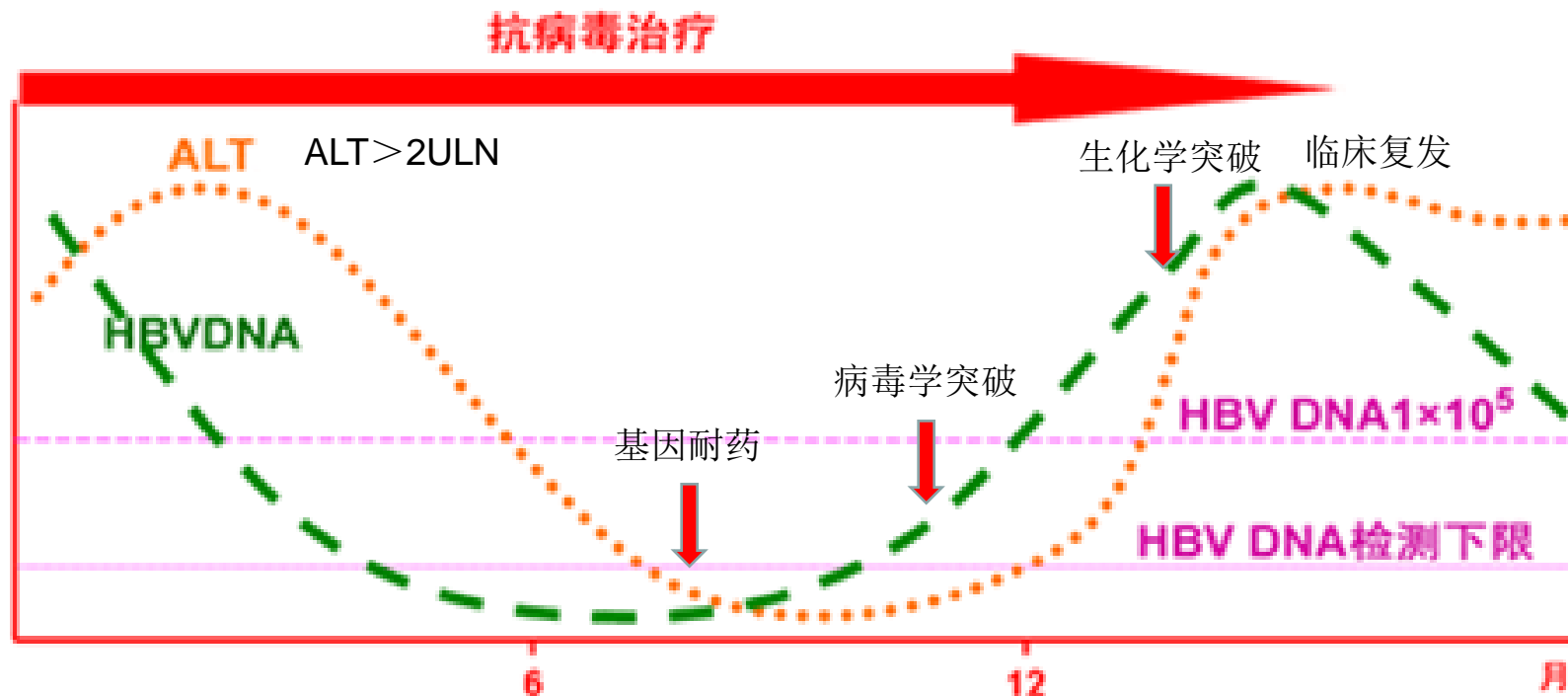
(EmmetB. Keefe等 , 2007 , 美国斯坦福大学亚洲肝病中心)

治疗过程中的耐药监测及管理

各种抗病毒药物的耐药发生率



从乙肝病毒变异到发生临床耐药



更早发现耐药引起的病毒学突破，及早调整更加适合的用药治疗方案

病毒学突破的定义

- 病毒学突破的定义-核苷类药物治疗依从性良好的患者，在未更改治疗的情况下，HBV DNA水平比治疗中最低点上升1个log值，或一度转阴后又转为阳性，并在1个月后以相同试剂重复检测加以确定，可有或无ALT升高。
- 乙型肝炎再活动—在HBV DNA持续稳定的患者，HBV DNA升高 $\geq 100 \text{ IU/ml}$ ，或基线HBV DNA阴性者由阴性转为阳性且 $\geq 100 \text{ IU/ml}$ ，缺乏基线HBV DNA者HBV DNA $\geq 2000 \text{ IU/ml}$ ，往往再次出现肝脏炎症坏死，ALT升高。常常发生于非活动性HBsAg携带者或乙型肝炎康复者中，特别是在接受免疫抑制治疗或化疗时。

我国《慢性乙型肝炎防治指南》（2015年版）

病毒学突破的定义

- AASLD 2015指南：病毒突破的定义为-患者HBV DNA的水平比测量最低点升高 $>1 \log$ （10倍）或是患者经过核苷类似物的治疗以后，由原先体内HBV DNA水平已低至最低检测下限（ $<10 \text{ IU/ml}$ ）上升至 100 IU/ml 。
- Viral breakthrough is defined by an increase in HBV DNA by $>1 \log$ compared to nadir or HBV DNA 100 IU/mL in persons on NA therapy with previously undetectable levels ($<10 \text{ IU/mL}$).

总结

- 指南推荐的HBV DNA最佳的检测灵敏度应 $< 10\text{IU/ml}$ （荧光定量PCR）
- 病毒学突破最佳的监测点应 $\leq 100\text{IU/ml}$
- 检测下限——定性要求
- 病毒学突破——定量要求

新颁布的注册技术审查指导原则



国家食品药品监督管理总局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（第3号）

2013年05月17日 发布

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

为加强对医疗器械注册工作的监督和指导，提高注册工作水平和审查质量，国家食品药品监督管理总局组织制定了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（见附件），现予印发，供医疗器械注册相关机构和人员参考。

附件：1. 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
2. 病原体特异性IgM免疫球蛋白定性检测试剂注册技术审查指导原则
3. 人类免疫缺陷病毒检测试剂临床研究注册技术审查指导原则
4. 流式细胞仪配套用检测试剂注册技术审查指导原则

国家食品药品监督管理总局
2013年5月17日

国家SFDA技术审评中心
《HBV-DNA定量试剂审评
指导原则》（2013年5月）
中建议：

- HBV-DNA最低检测限：
 $\leq 30 \text{ IU/ml}$
- 不建议采用煮沸法提取，
要求试剂盒具有核酸纯化步骤。

国内检测试剂的行业标准

- 扩增部分

- ①内参-监控假阴性
- ②UNG酶防污染-防止假阳性

中华人民共和国医药行业标准

YY/T 1182—2011

核酸扩增检测用试剂(盒)

Nucleic acids amplification test reagents(kits)

最新行业标准 (2012.6.1实施)

附录 A

(规范性附录)

对外诊断用 HIV、HBV、HCV 核酸扩增检测试剂盒产品设计的要求

体外诊断用 HIV、HBV、HCV 核酸扩增检测试剂盒产品设计要求：

- a) 在产品设计中,应加入全程参与的内标;
- b) 在扩增检测前,样品(含质控品、标准品)应进行核酸提取、纯化;
- c) 核酸加样体积不小于 20 μ L;总反应体积不小于 40 μ L。

2012-06-01 3

高标准注册 获得CFDA认可

1. 《中华人民共和国医药行业标准YY/T 1182-2010核酸扩增检测用试剂盒》
2. 国家SFDA技术审评中心《HBV-DNA定量试剂审评指导原则》（2013年5月）

注册证编号	国食药监械(准)字2013第3401362号
注册人名称	上海复星长征医学科学有限公司
注册人住所	宝山区城银路830号
生产地址	宝山区城银路830号
代理人名称	
代理人住所	
产品名称	乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光探针法)
型号、规格	32人份/盒
结构及组成	产品组成: 核酸提取试剂: 96孔预装板1、蛋白酶K。 扩增试剂: PCR缓冲液 A、HBV 引物探针、Taq 酶、内参。质控试剂: HBV定量校准品S1、HBV定量校准品S2、HBV定量校准品S3、HBV定量校准品S4、HBV 定量校准品S5、HBV临界阳性对照、HBV强阳性对照、阴性对照。产品有效期: 扩增试剂及质控试剂: -20℃保存; 核酸提取试剂: 常温保存。有效期12个月。附件: 注册产品标准, 产品说明书。
适用范围	该产品用于定量检测人血清和血浆样本中的乙型肝炎病毒DNA。
其他内容	
备注	
批准日期	2013. 09. 07
有效期至	2017. 09. 06
附件	
产品标准	YZB/国 4819-2013

星耀 HBV DNA 高敏检测试剂盒

提取方法：全自动磁珠法提取

样本类型：血清、血浆

线性范围： $1 \times 10^2 - 1 \times 10^9$ IU/ml

定量检测下限：100 IU/ml

最低检出限：15 IU/ml

同时反应体系中加入了UNG酶，
可有效防止扩增体系的污染。

使用非竞争性内参，可监控
和避免由样本中的抑制物引起的“假阴性”结果。



国食药监械（准）字2013第3401362号

两大自动化平台

仪器+试剂+技术平台完美整合

全自动核酸提取仪



台湾 圆点纳米科技

PCR处理自动化一体式工作站



瑞士 帝肯 Tecan

谢 谢！

技术服务热线：800-820-7902

Innovation for Good Health!

持续创新 共享健康