

肝炎病毒核酸检测技术应用新进展

圣湘生物：吴金勇



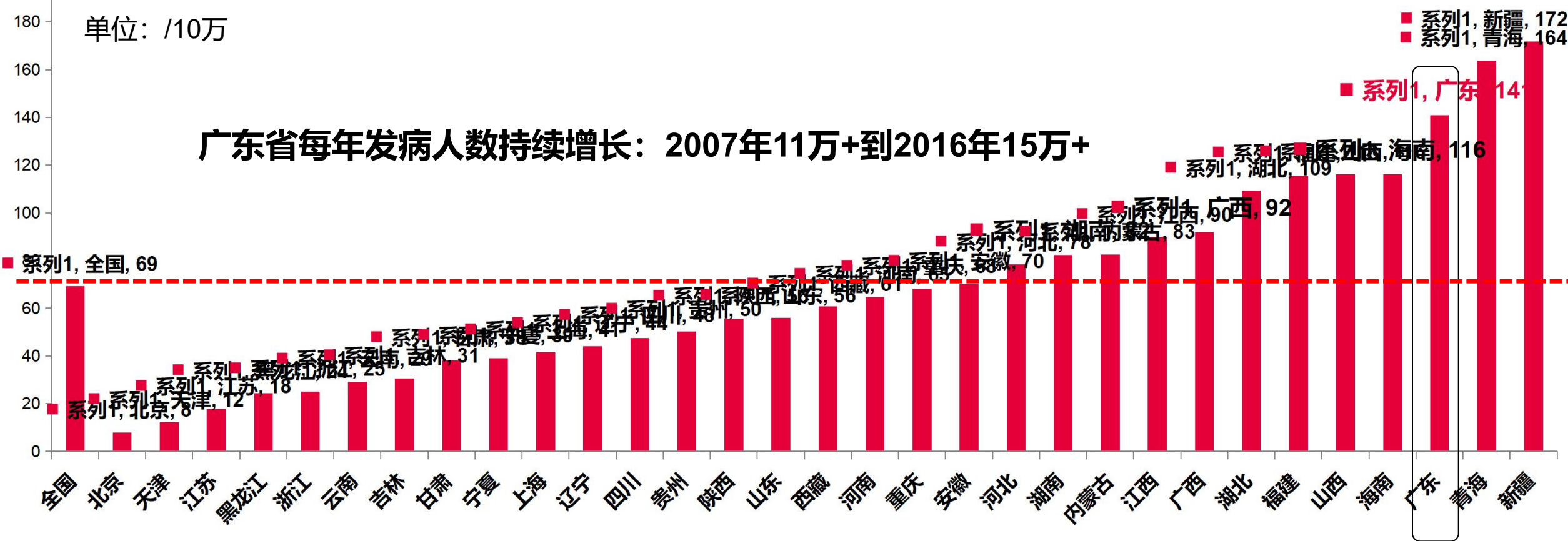
圣湘生物
Sansure Biotech

您的健康 我的追求
Your health is my pursuit

中国乙肝流行现状

中国各地报告乙肝发病率（2016年）

单位：/10万



数据来源：国家公共卫生科学数据中心

病毒性肝炎防控，疫苗预防重要，发现、确诊患者也尤为重要

防

疫苗接种和健康科普

中国乙肝疫苗接种率95%以上

“消除乙肝，广东先行” 乙型肝炎母婴阻断

控

控制传染源

- 发现更多患者
- 确诊更多患者

精准诊疗技术至关重要

消除肝炎公共健康危害



圣湘生物
Sansure Biotech

3

乙肝病毒核酸检测精准判断病毒复制水平

慢性乙型肝炎病毒标志物的检测

◆免疫学检测：HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe、抗HBc

◆分子生物学检测：**HBV DNA**



核酸提取和检测技术进展



手工核酸提取



半自动核酸提取



全自动核酸提取仪



手工PCR检测

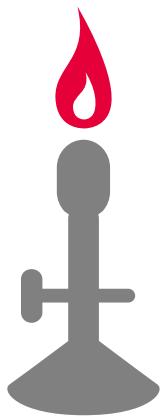


定性PCR检测



实时荧光定量PCR检测

核酸提取方法学进展



煮沸法

◆操作简便

◆容易污染



柱提法

◆提取纯度高

◆操作复杂



磁珠法

◆自动化，通量高

◆技术要求高



高精度磁珠法核酸技术(一)——超顺纳米磁珠技术



- **纳米核-壳技术**：磁性核心+分子聚合物外壳+官能集团（疏水作用力、氢键作用力、静电作用力等特异吸附核酸）
纳米级别，**表面比最大化**，保证核酸富集空间。
- **爪-刷表面修饰技术（claw&brush）**：核心专利技术，实现不同片段不同核酸类型的统一提取。
- **脱磁超顺技术**：磁珠置于磁场时，显示其磁性，离开磁场时，磁性消除，不成团，不凝集长时间均匀分散。



高灵敏HBV DNA检测试剂



技术更先进、灵敏度更高

磁珠法操作步骤

乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒(磁珠法):

- ◆ 灵敏度高: 10 IU/ml
- ◆ 线性范围宽: 20 IU/ml ~ 2×10^9 IU/ml
- ◆ 覆盖**A—H** 8种HBV基因亚型, 避免漏检
- ◆ 全程内标监控

裂解液+样本+磁珠溶液
↓
常温静置10min
↓
放入磁力架进行磁吸, 去废液
↓
加入洗液, 混匀, 瞬时离心
↓
放入磁力架进行磁吸, 去废液
↓
加入洗脱液, 洗脱核酸用于扩增



高敏HBV DNA检测试剂特点

常温裂解

内标全程监控

一次洗涤

UNG酶+dUTP

带磁珠扩增

抗干扰能力强

内参比荧光ROX

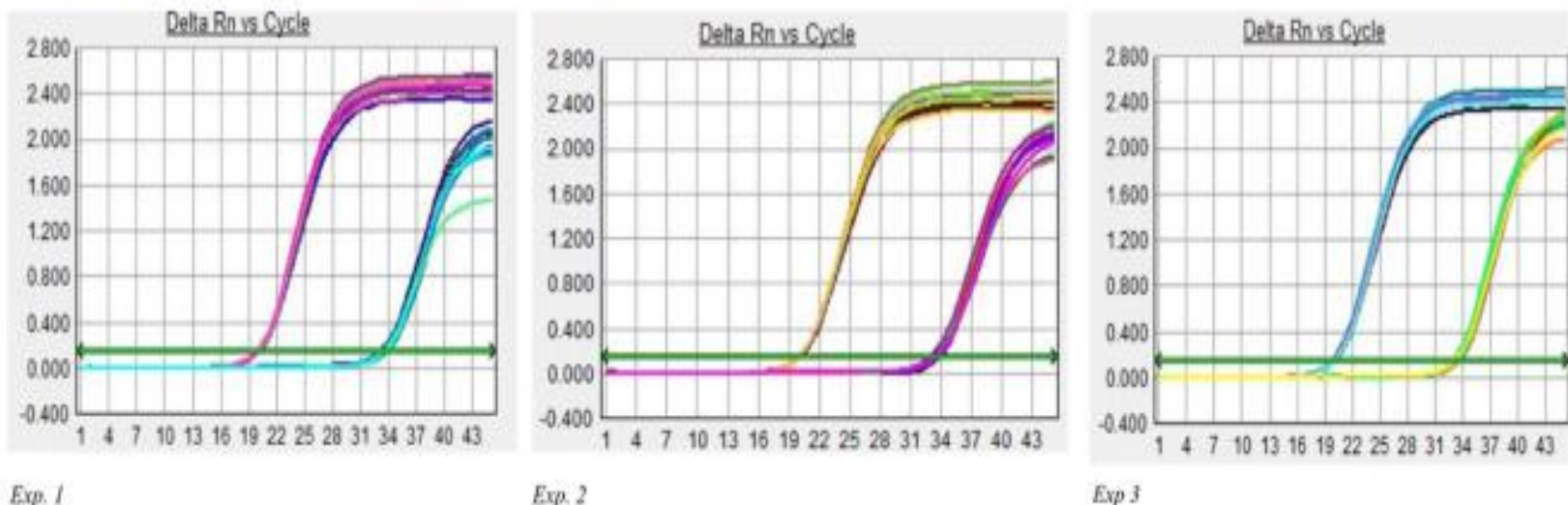
可全自动化



国产高敏HBV DNA质量评价，与进口试剂性能相当

中南大学附属湘雅医院、中国医科大学附属盛京医院、南方医科大学附属南方医院

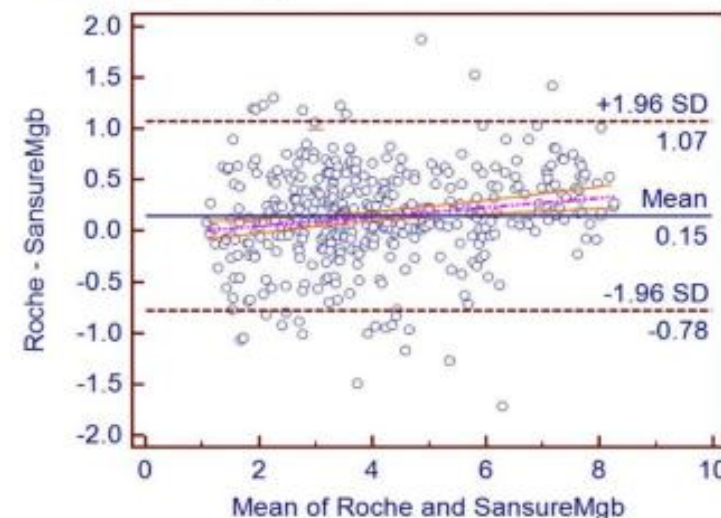
Figure 1. Real-time PCR results from three different experiments.



SYBR Green fluorescence charts are shown for three different Sansure Magb experiments in which 10 high-concentration and 10 low-concentration replicates per experiment were amplified by real-time PCR. The high concentration samples uniformly reached the threshold (green line) at an earlier cycle than that of the low concentration samples.

结果: Exp1 高浓度CV%=0.43% 低浓度CV%=3.16%
Exp 2 高浓度CV%=0.35% 低浓度CV%=3.46%
Exp 3 高浓度CV%=0.81% 低浓度CV%=3.04%
Exp 1-3 高浓度CV%=0.56% 低浓度CV%=3.65%

Figure 2. Bland-Altman plot of the Sansure Magb assay and the Roche CAP/CTM assay.

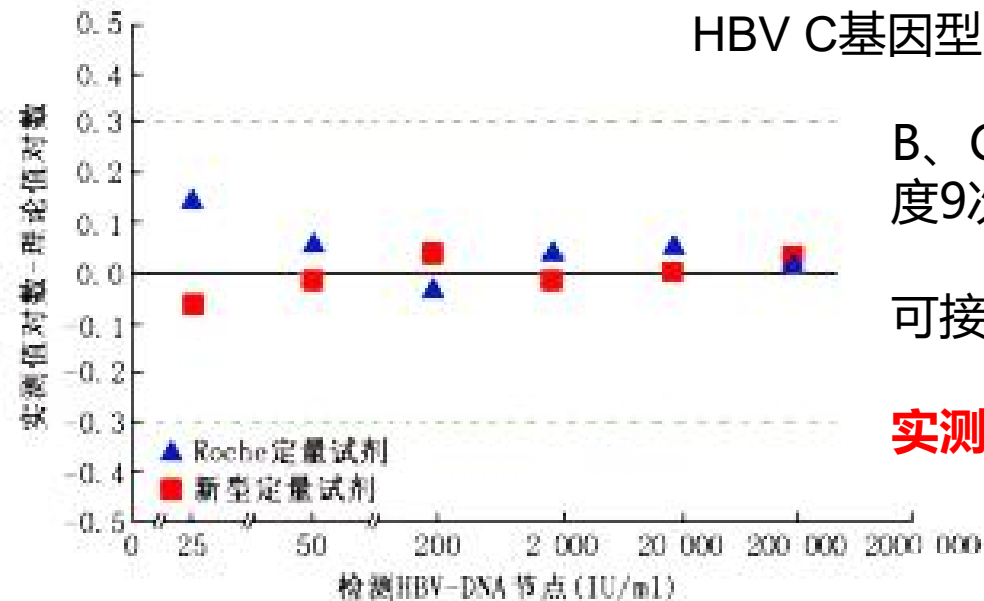
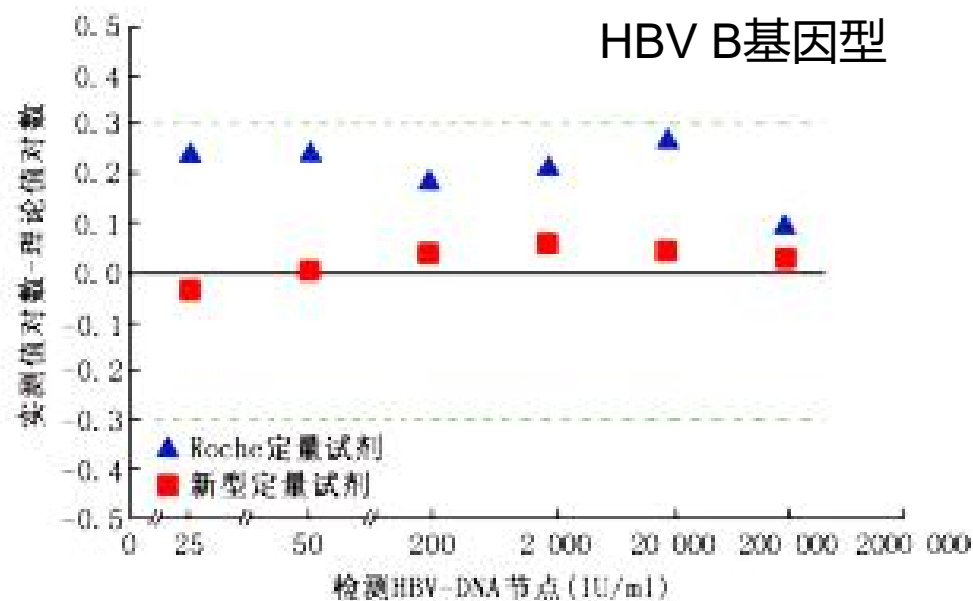


The x-axis shows the mean value measured using the two methods, and the y-axis shows the difference between the values measured using the two methods (in log unit). Dotted red lines show the 95% limits.

方法: 用635名慢乙肝患者血清样本, 分别用圣湘和罗氏试剂检测HBV DNA定量结果相当。

国产高敏HBV DNA质量评价，与进口试剂性能相当

北京大学医学部感染病研究中心、中南大学附属湘雅医院、北京佑安医院



B、C基因型血浆不同浓度9次重复，取均值

可接受 $\leq \pm 0.3 \lg \text{ IU/mL}$

实测 $\leq \pm 0.1 \lg \text{ IU/mL}$

2种 HBV DNA定量试剂检测HBV B基因型和C基因型标准血浆相对偏差(实测均值-理论均值)分析

国产试剂在准确性、精密度上和进口试剂性能相当，更适合中国适用。

高敏HBV DNA定量检测——指导慢乙肝的治疗

表 1 根据停药时 HBsAg 定量分组的复发情况比较

组别	例数	复发(例)	SVR(例)	复发率(%)
A 组	6	1	5	16.7
B 组	40	10	30	25.0
C 组	159	124	35	78.0 ¹⁾²⁾

注:与 A 组比较,1) $P=0.03$;与 B 组比较,2) $\chi^2=40.798, P<0.0001$

A组: HBsAg < 0.03 IU/mL ; B组: 0.03--100 IU/mL
C组: > 100 IU/ml

表 2 根据停药时高灵敏度 HBV DNA 载量分组的复发情况比较

组别	例数	复发(例)	SVR(例)	复发率(%)
A 组	30	15	15	50.0
B 组	80	47	33	58.8
C 组	54	38	16	70.4 ¹⁾
D 组	41	35	6	85.4 ¹⁾²⁾

注:与 A 组比较,1) χ^2 值分别为 38.551、50.508, P 值均 < 0.0001 ;
与 B 组比较,2) $\chi^2=8.791, P=0.003$

A组: 检测不到; B组: < 20 IU/mL
C组: 20--1000IU/ml D组: > 1000 IU/mL

表 3 根据停药时 HBsAg 定量、高灵敏度 HBV DNA 载量进行分组的复发情况比较

组别	例数	复发(例)	SVR(例)	复发率(%)
A 组	35	5	30	14.3
B 组	170	130	40	76.5

A组: HBsAg≤100 IU/mL , HBV DNA < 20 IU/mL ;
B组: HBsAg > 100 IU/mL , HBV DNA ≥20 IU/mL

◆高灵敏度HBV DNA 载量 < 20 IU/ml 联合 HBsAg 定量≤100 IU/ml 作为停药指标, 停药较为安全。

高精度磁珠法核酸技术(二)——全自动核酸提取系统

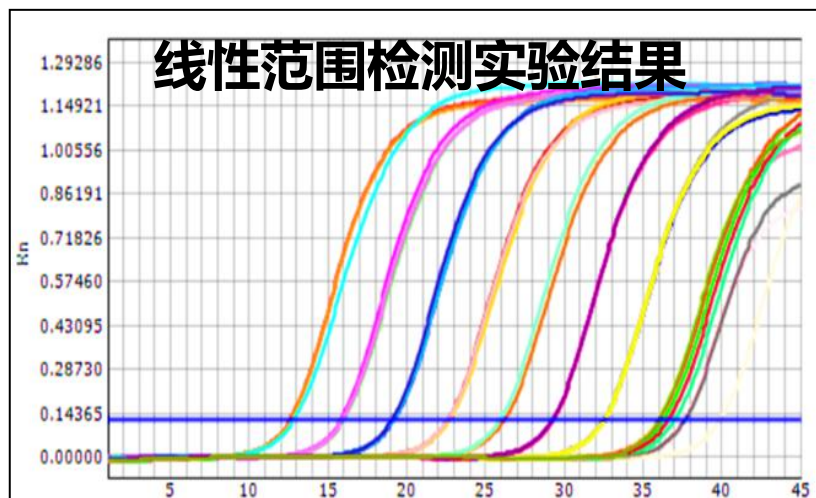
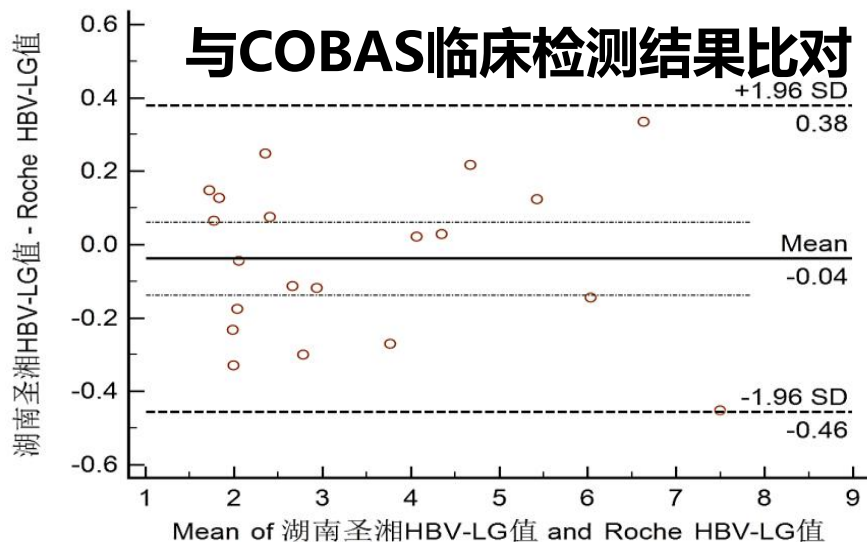


Natch 系列全自动核酸提取系统

- ◆ 自动液体处理及项目，96/48个样本≤90分钟
- ◆ 核酸纯化仅需一次洗涤，核酸免洗脱，带磁珠扩增，内标全程监控；
- ◆ 常温化学裂解，无需加热煮沸



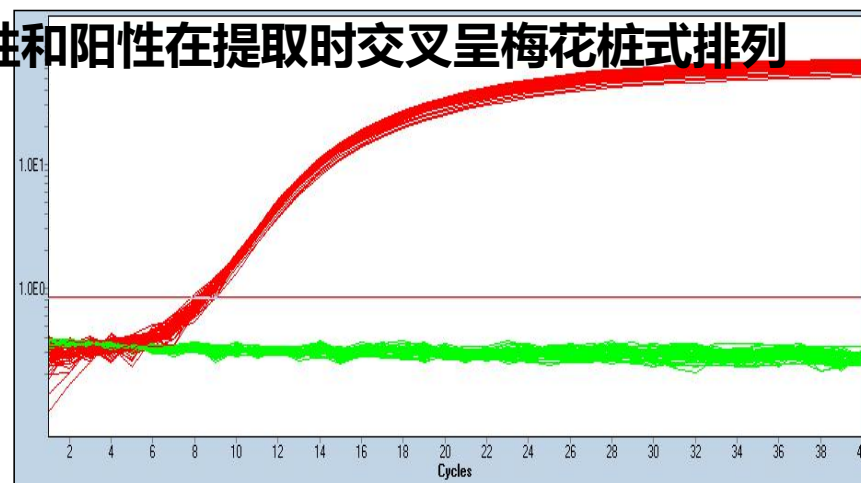
解放军某医院测评：Natch系列全自动核酸提取系统 + HBV DNA试剂



高浓度临床标本梯度稀释 线性范围的 R^2 值=0.9993

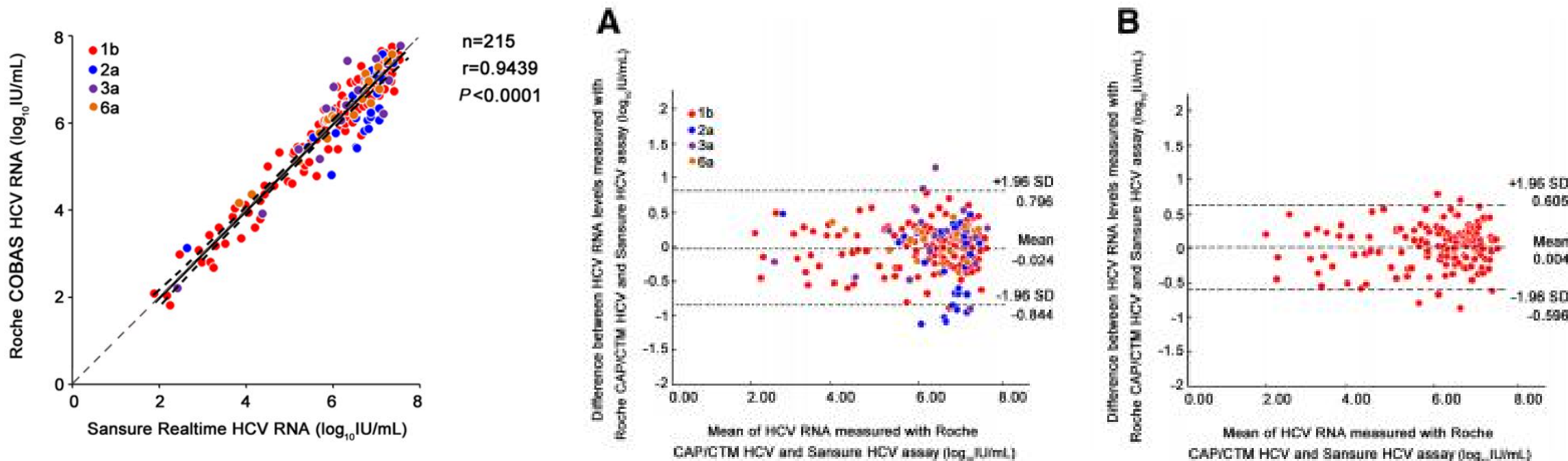
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

试验设计：连续进行两批96份样本提取和检测，
每批样本包括48个 10^8 IU/mL和48个阴性样本，
阴性和阳性在提取时交叉呈梅花桩式排列



Natch系列全自动核酸提取系统+HCV试剂，与进口产品性能相当

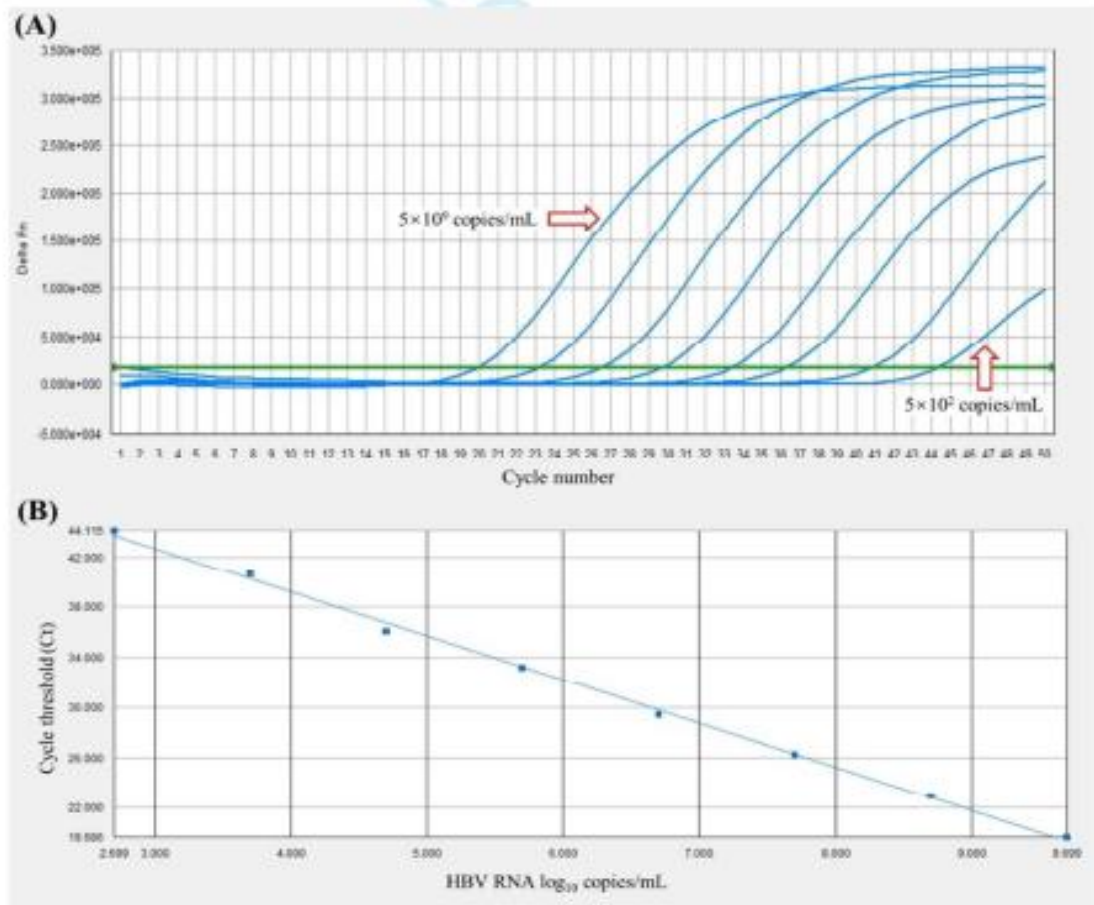
北京大学医学部感染病研究中心、南方医科大学附属南方医院、中南大学附属湘雅医院



国产全自动核酸提取系统与 CAP/CTM系统检测HCV基因型别对比，各浓度定量值均无显著差异。

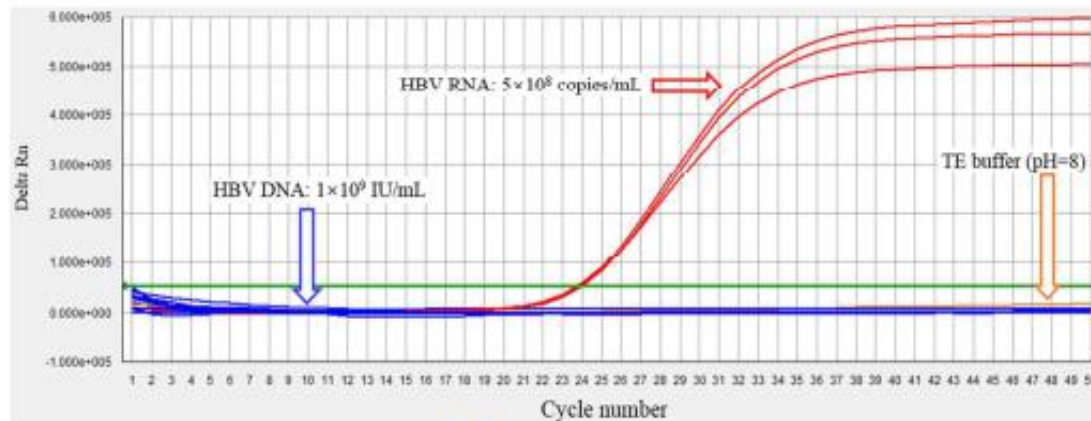
Natch系列全自动核酸提取系统 + HBV RNA试剂

HBV RNA是PegIFN α 治疗HBeAg阳性患者HBeAg血清学转换的早期预测因子



多中心研究:

中南大学湘雅二医院、上海瑞金医院等14家国内外医疗机构



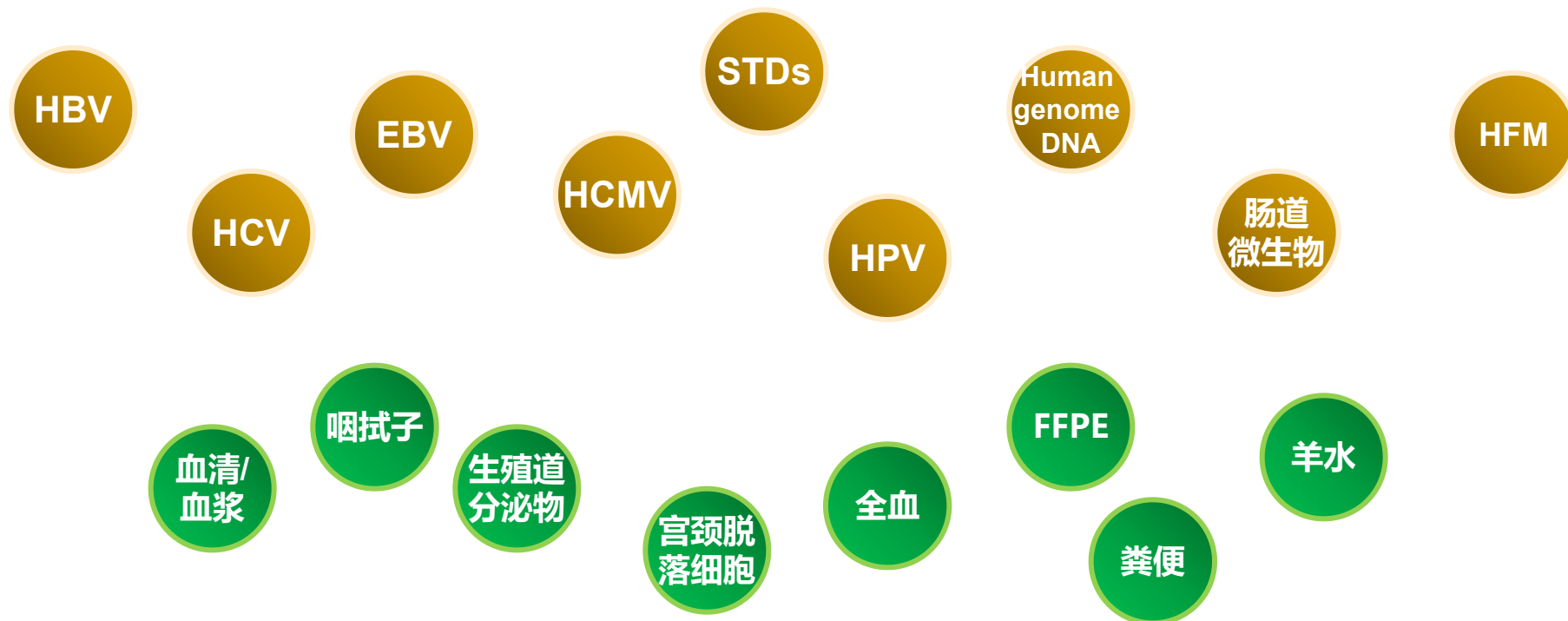
HBV RNA试剂:

灵敏度: 100 copies/mL

线性范围: 5.0+E02----5.0+E09 copies/mL

HBV DNA 对实验没有干扰

高精度磁珠法核酸技术(三)——统一提取试剂



SUPRA™



圣湘生物
Sansure Biotech

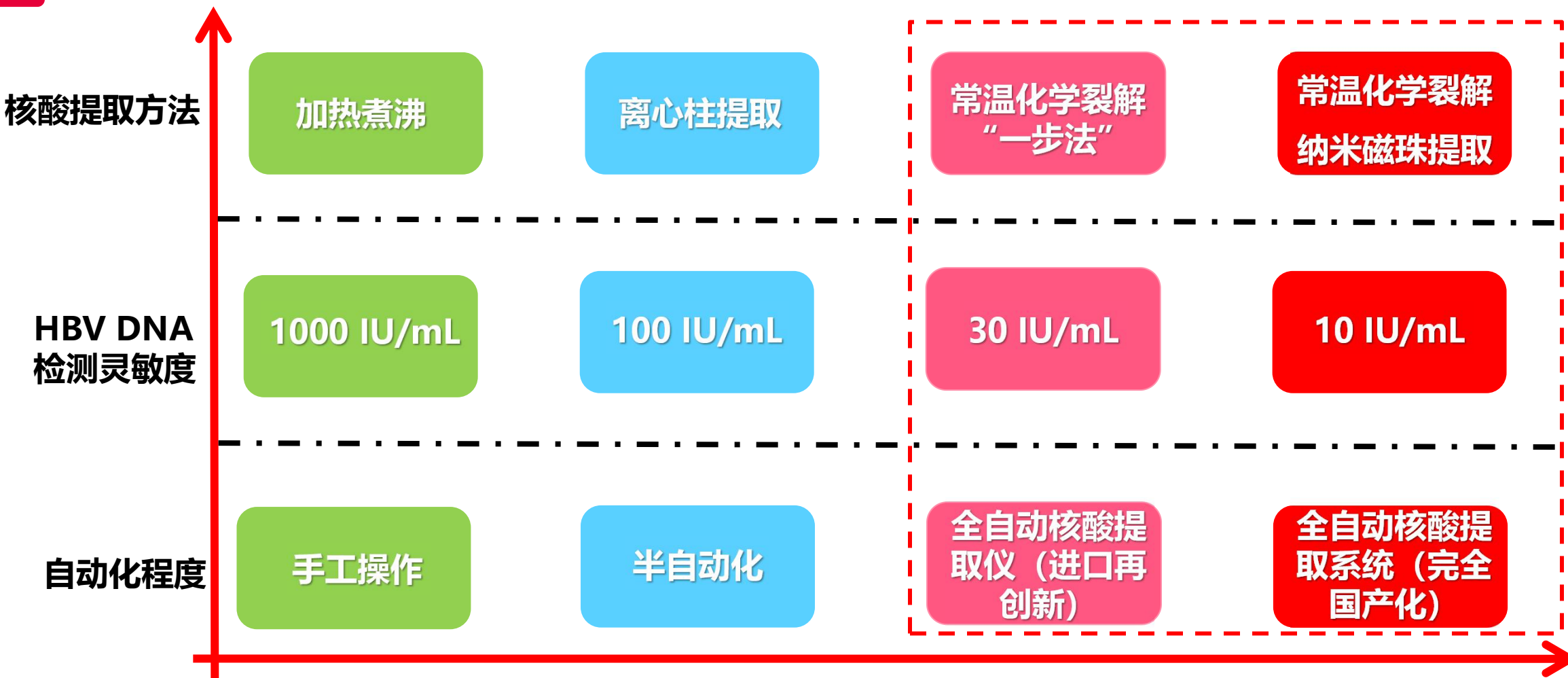
统一提取试剂应用价值

➤全国最大三甲医院之一的四川某医院： **2016年引入SUPRall+Natch S通用系统**



2015年引进一台Natch 系列开展高敏乙肝项目，2016年引进2套SUPRall+Natch S通用系统，整合STDs、HCMV、EB、肿瘤个体化和标本库建设等多个项目统一提取，检测能力大幅提升，在不增加工作人员的情况下，日检测标本量从200余例增长至700余例

HBV DNA定量检测技术进步，推动诊疗水平提升



肝炎病毒核酸分子诊断方法的不断提高，使肝炎的精准诊疗成为可能，为临床治愈病毒性肝炎奠定坚实基础



中国人的智慧、 中国人的技术

解决中国的慢性乙肝防治问题

Thanks



圣湘生物
Sansure Biotech

www.sansure.com.cn