

高敏肝炎病毒载量检测对于临床的意义

顾琳

中山大学附属第三医院



HBV DNA水平是慢性乙肝的治疗目标的关键终点

中国慢性乙型肝炎防治 指南 (2015)



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；改善生活质量和延长存活时间

APASL指南 (2015)



CHB 的治疗目标是通过预防疾病进展为肝硬化、失代偿肝硬化、终末期肝病、HCC 以及死亡，改善生活质量和生存率；并预防乙肝向其他人传播。这一目标可通过**持续性抑制HBV 复制**来达到。

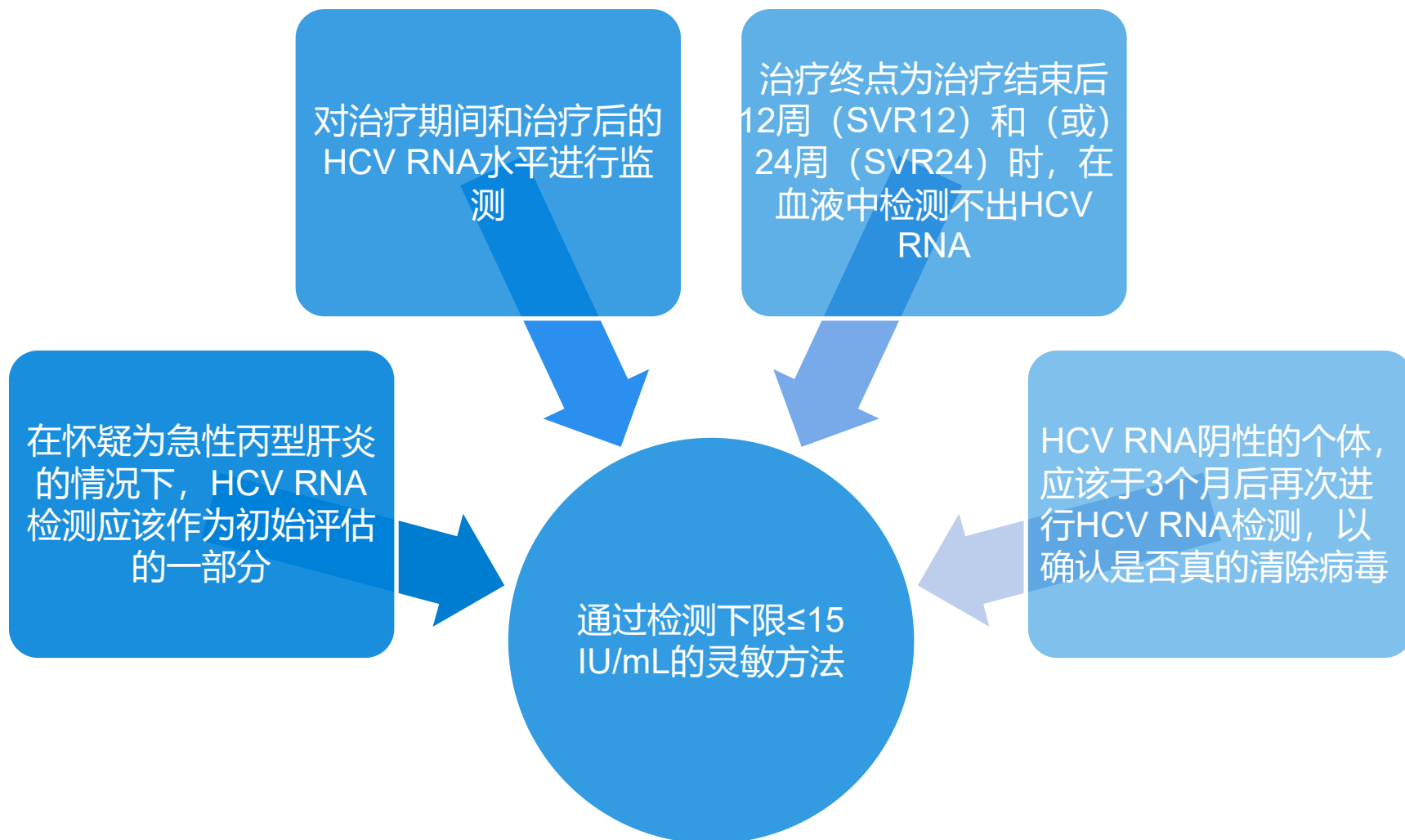
EASL临床实践指南 (2017)



CHB 的治疗目标是通过预防疾病进展为肝硬化、失代偿肝硬化、终末期肝病、HCC 以及死亡，改善生活质量和生存率。**如果HBV 复制得到持续抑制，那么这一目标可以达到。**

指南特别提出对于失代偿性肝炎，HBV DNA > 20IU会增加肝癌几率。

2016年EASL丙型肝炎治疗推荐意见



《2016年EASL丙型肝炎治疗推荐意见》 DAA药物



| | 2016年欧洲可获得药物 | 备注 |
|-----------------|--------------------------------|------|
| Sovaldi吉一代 | NS5B聚合酶核苷类似物抑制剂 | |
| Harvoni吉二代 | NS5B聚合酶核苷类似物抑制剂/NS5A抑制剂 | |
| Epclusa吉三代 | NS5B聚合酶核苷类似物抑制剂/NS5A抑制剂 | 欧洲新增 |
| Technivie奥比帕利 | NS3/4A蛋白酶抑制剂/NS5A抑制剂/CYP3A4抑制剂 | |
| 达塞布韦Dasabuvir | NS5B聚合酶非核苷类似物抑制剂 | |
| Zepatier | NS3/4A蛋白酶抑制剂/NS5A抑制剂 | 欧洲新增 |
| 达卡他韦Daclatasvir | NS5A抑制剂 | |
| 西咪匹韦Simeprevir | NS3/4A蛋白酶抑制剂 | |

中国指南推荐RT-PCR方法用于HBV、HCV病毒核酸检测



中華醫學會

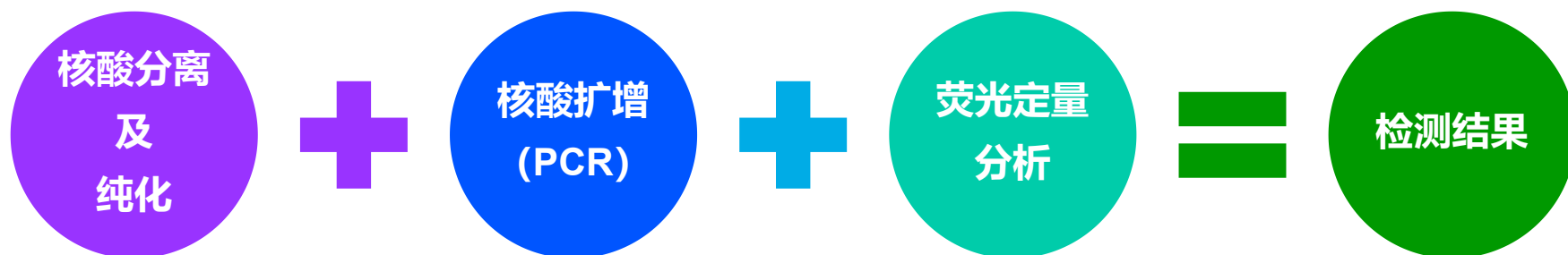
慢性乙型肝炎防治指南（2015）

- HBV DNA 定量检测建议采用灵敏度和精确度高的**实时定量聚合酶链反应（real-time quantitative PCR）**法。

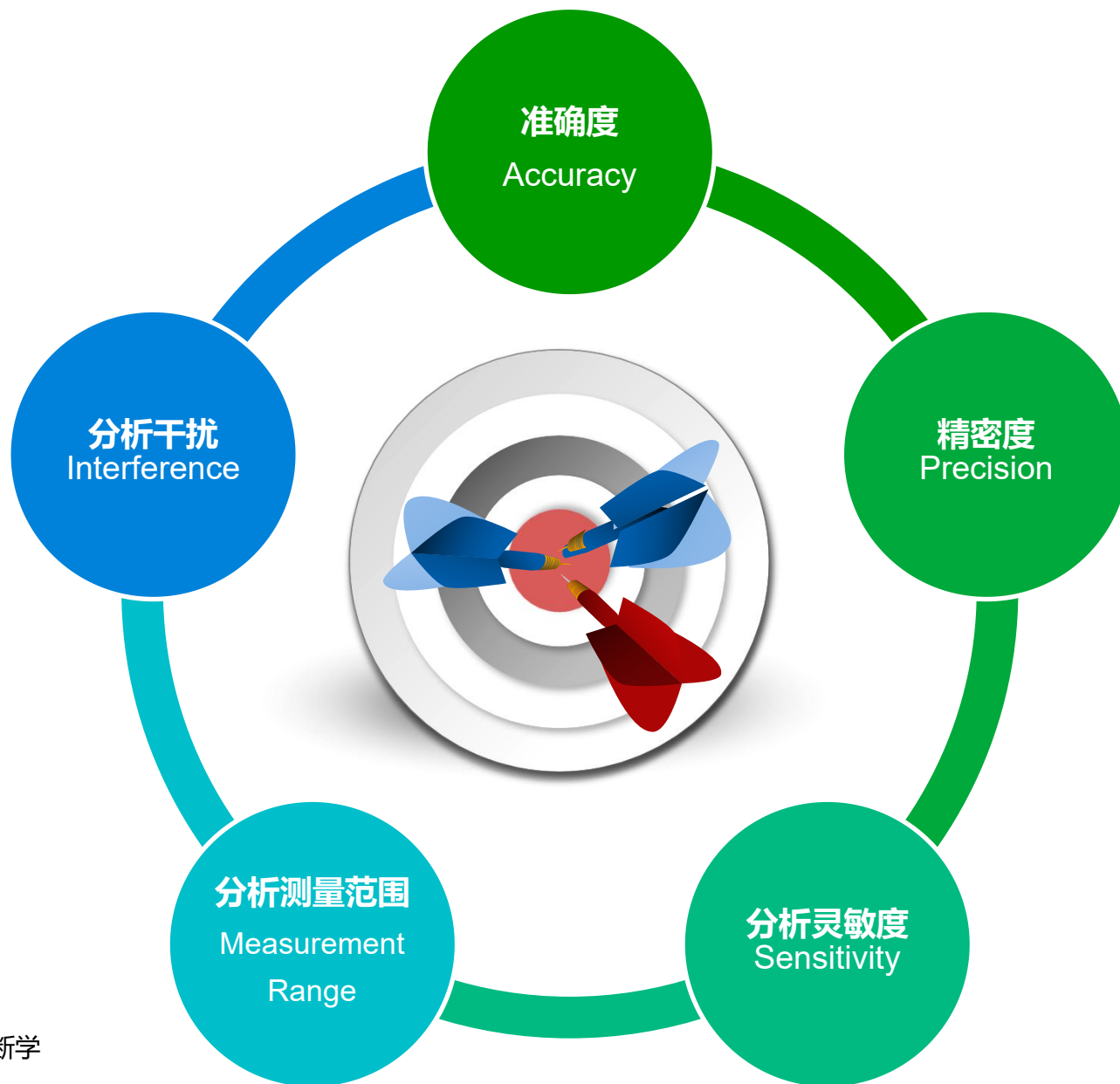
丙型肝炎防治指南（2015）

- HCV RNA 定量检测应当采用基于**PCR 扩增**、灵敏度和精确度高并且线性范围广的方法；检测下限：< 15IU/mL

荧光定量PCR的工作流程

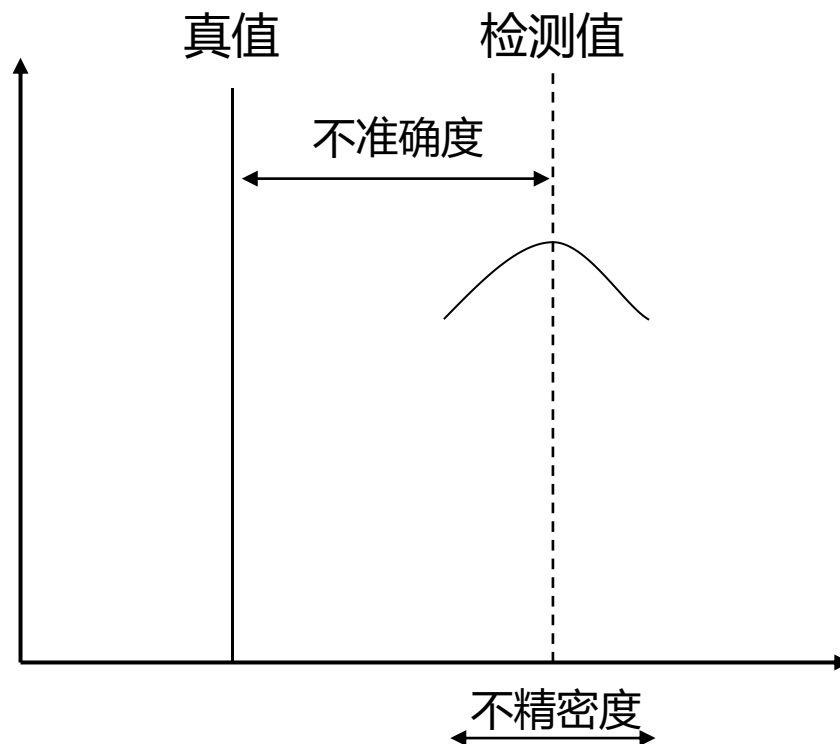


荧光定量PCR的检测性能评价指标



准确度和精密度是最重要的检测系统性能指标

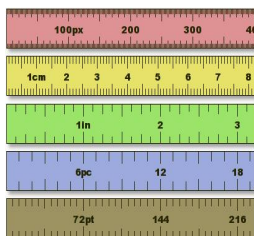
- 准确度 (Accuracy)
 - 不准确度
- 精密度 (Precision)
 - 重复性
 - 中间精密度



衡量“准确”的标准

-cobas® TaqMan HBV/HCV可溯源至WHO标准品

- 准确度：定义为真值与检测值的一致程度，



不同的标准
copy

VS.



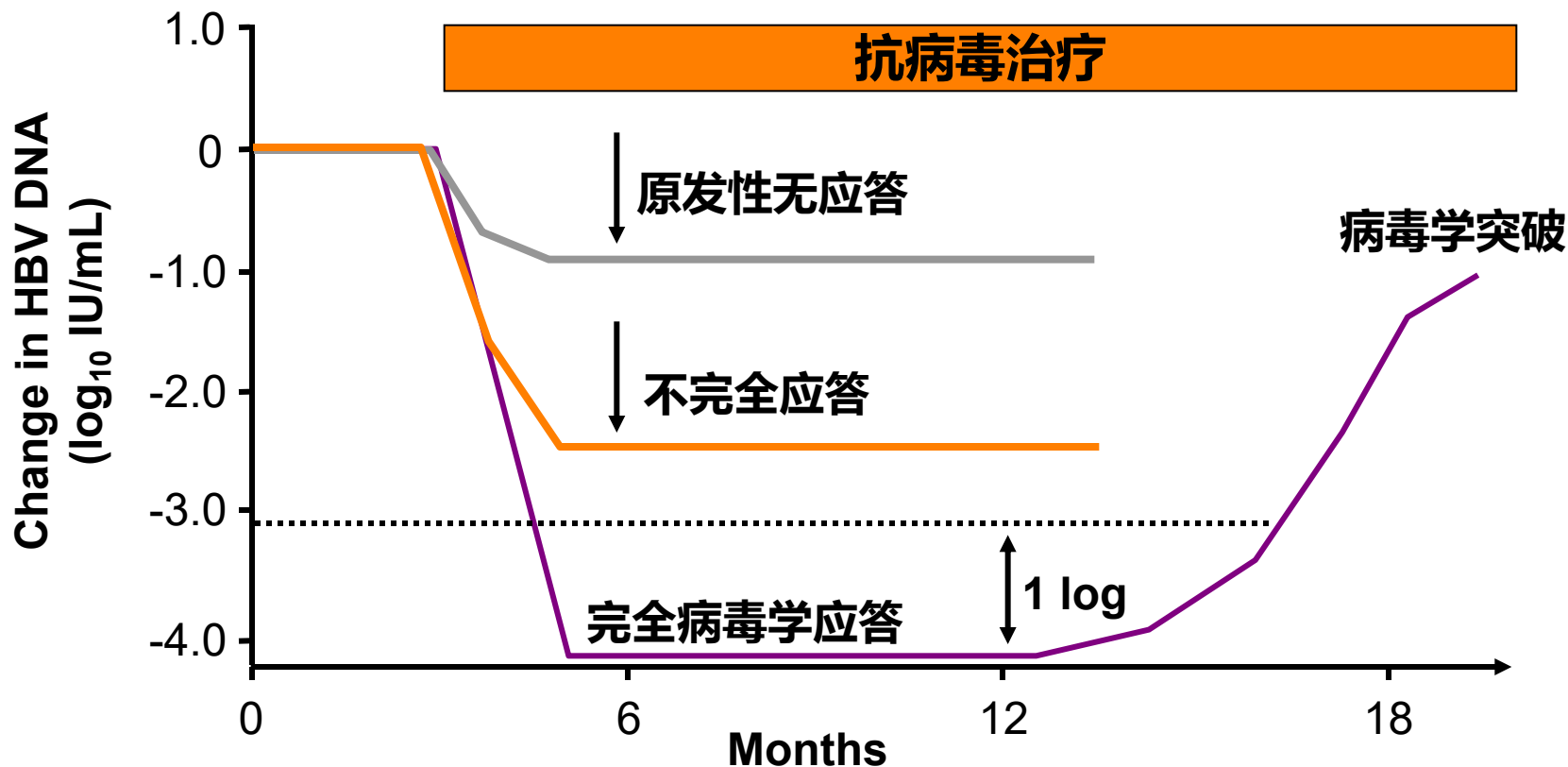
标准米
IU/ml

CFDA

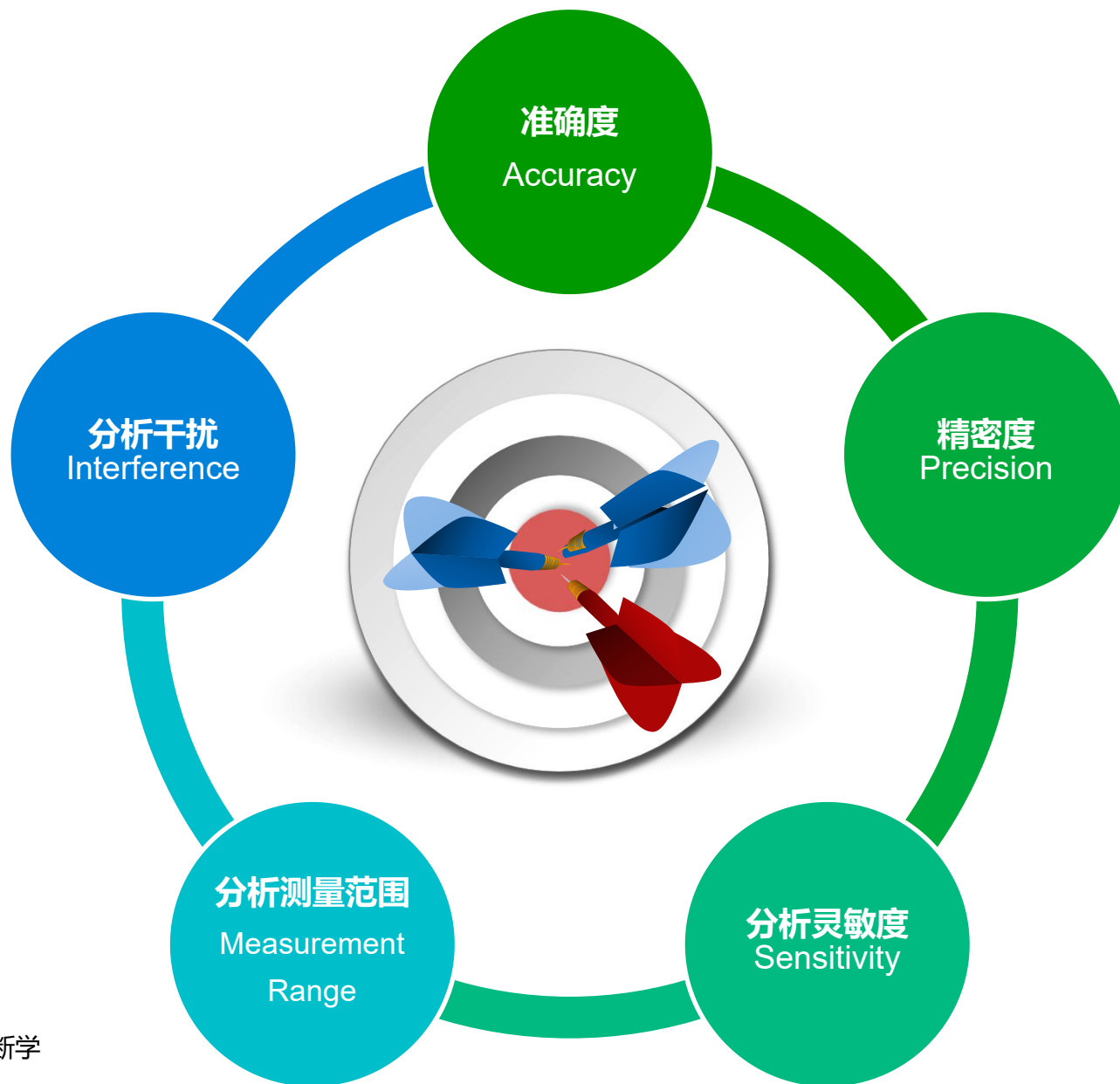
乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸定量检测试剂注册技术审查指导原则
丙型肝炎病毒核糖核酸测定试剂技术审查指导原则

准确度：对相应参考品的符合情况

良好的精密度帮助医生准确判断病毒动力学变化

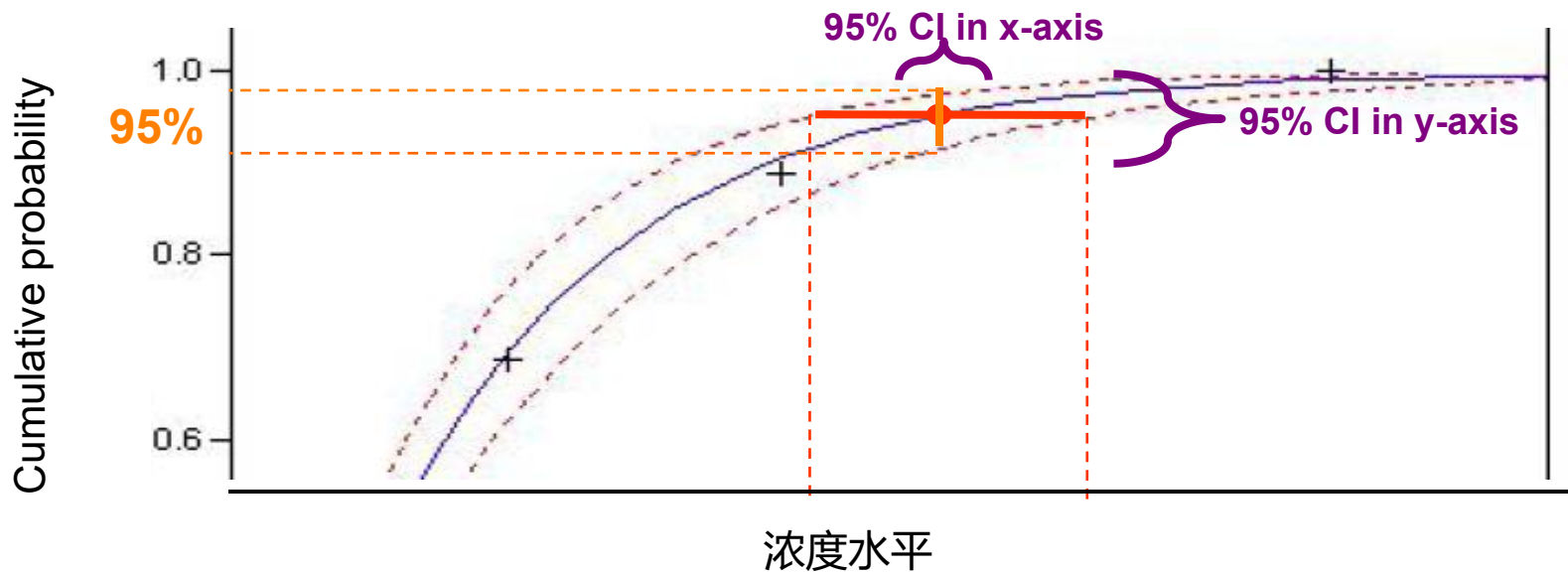


荧光定量PCR的检测性能评价指标

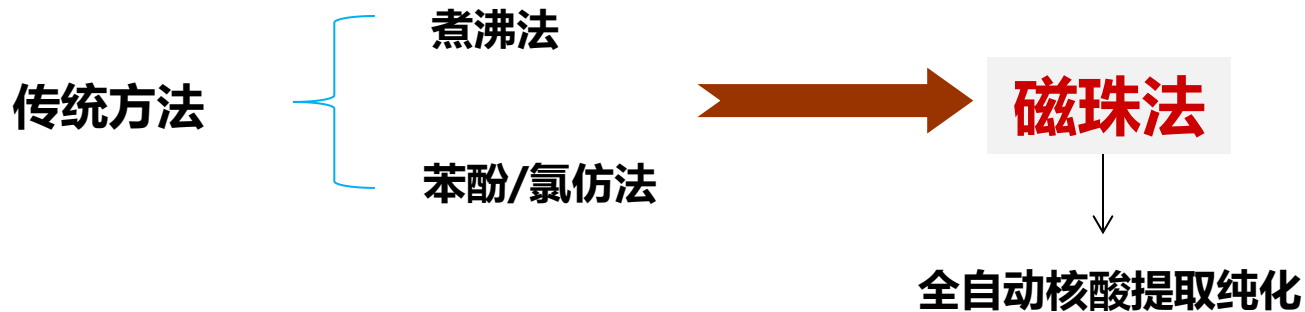


分析灵敏度是重要的临床诊断性能指标之一

- 分析灵敏度性能
 - 检出限 (LoD) : 达到95%阳性检出率的分析物最低浓度

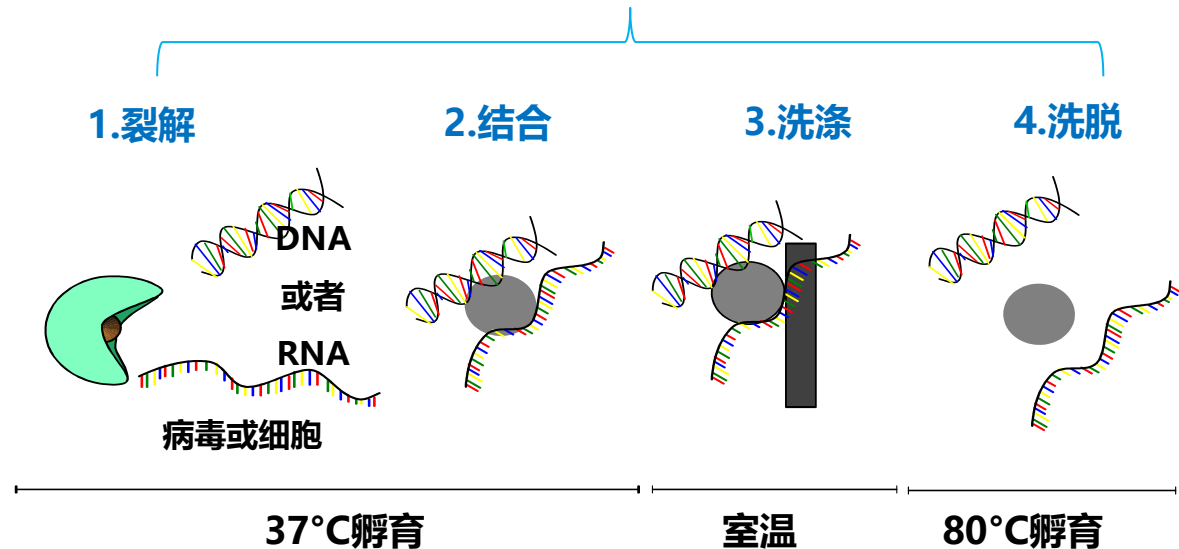


磁珠法核酸分离技术示意图



技术原理:

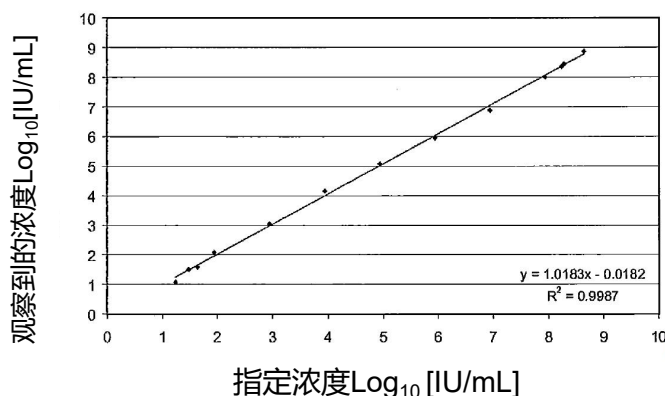
通过超顺磁性颗粒与核酸分子特异性识别和高效结合，在外加磁场作用下，把血液等样本中的核酸分离出来。



分析测量范围是重要的临床诊断性能指标之一

- 分析测量范围性能

- 线性范围：**覆盖检测系统的可接受线性关系的范围，非线性误差小于设定标准



国内常见HBV DNA检测产品线性范围：

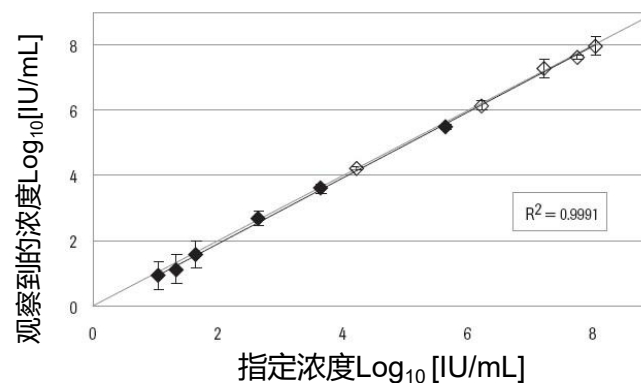
进口： 20 IU/mL-1.7E+08 IU/mL

国产： 500-1000 IU/mL-1.7E+08 IU/mL

国内常见HCV RNA检测产品线性范围：

进口： 15 IU/mL-1.0E+08 IU/mL

国产： 500-1000 IU/mL-1.7E+08 IU/mL



1. Cobas AmpliPrep_Cobas TaqMan HBV test-version 2.0中文说明书
2. Cobas AmpliPrep_Cobas TaqMan HCV quantitative test-version 2.0中文说明书

Cobas® AmpliPrep/cobas® TaqMan HBV/HCV

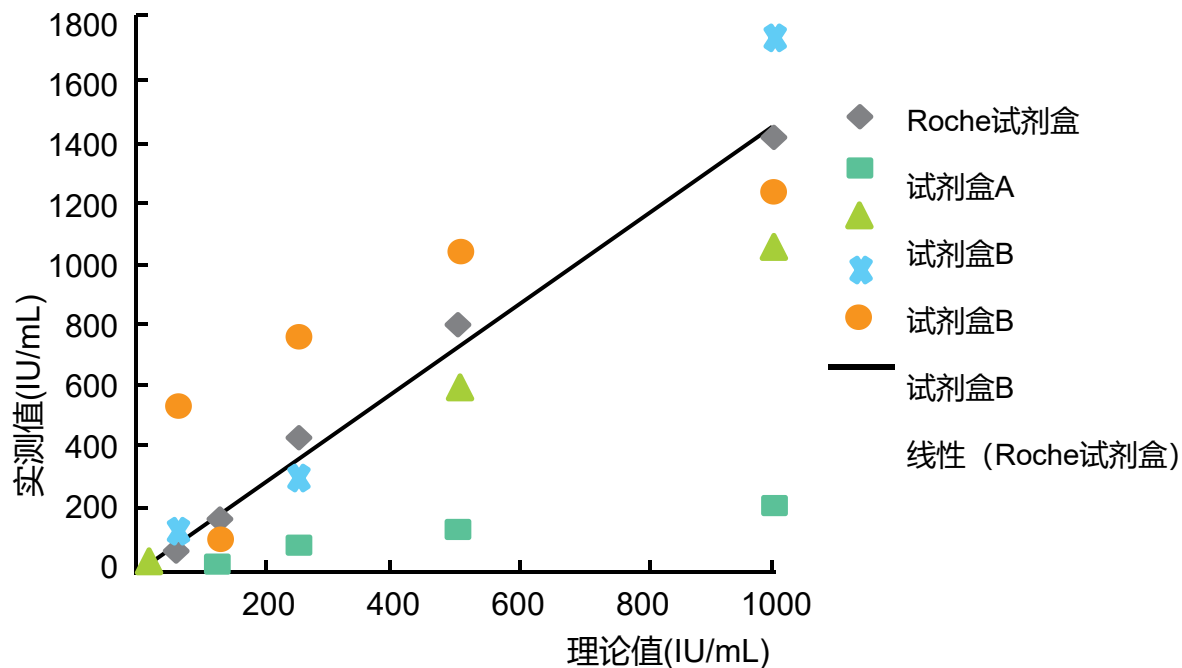
- 检测性能可靠, 更好满足临床需要



Cobas® TaqMan HBV/HCV可准确检测稀释血浆

- 拓宽临床适用浓度范围

- Cobas试剂盒实测值与理论值存在较好的相关性，可准确检测稀释血浆



5种HBV DNA定量检测试剂盒对
灵敏度稀释样本的检测结果

干扰是造成分析误差的重要原因

应对干扰方案：

- ✓ 改进分析特异性，用交叉实验评估干扰

对含有不同病原体（见下表）的高浓度溶液进行稀释并检测，未见非靶标病原体对Cobas® TaqMan HBV/HCV定量检测试剂盒的测试性能产生干扰，亦未见假阳性结果

cobas® TaqMan® HCV V2.0的交叉反应评估样本

| | |
|--|--|
| 非HCV虫媒病毒 西尼罗病毒 圣路易脑炎 澳洲墨莱溪谷病毒 登革病毒1, 2, 3和4 黄热病病毒 寨卡病毒 初夏脑膜炎病毒 (strain HYPR) | 病毒 腺病毒5型 巨细胞病毒 人类疱疹病毒 乙型肝炎病毒 甲型肝炎病毒 人类免疫缺陷病毒 (HIV) 1型 人类T细胞白血病病毒1型和2型 人类疱疹病毒6型 单纯疱疹病毒1型和2型 甲型流感 人类乳头状瘤病毒 水痘带状疱疹病毒 |
| 细菌 痤疮丙酸杆菌 金黄色酿脓葡萄球菌 | |
| 酵母 白色念珠菌 | |

cobas® TaqMan® HBV V2.0的交叉反应评估样本

| | |
|----------------------------------|---|
| 酵母 白色念珠菌 | 病毒 腺病毒5型 巨细胞病毒 EB病毒 人类疱疹病毒6型 甲型肝炎病毒 人类T细胞亲淋巴细胞1型和2型 单纯疱疹病毒1型和2型 甲型流感 |
| 细菌 短小棒状杆菌 金黄色酿脓葡萄球菌 | |

1. Cobas AmpliPrep_Cobas TaqMan HBV test-version 2.0中文说明书
2. Cobas AmpliPrep_Cobas TaqMan HCV quantitative test-version 2.0中文说明书

干扰是造成分析误差的重要原因

应对干扰方案：

✓对潜在干扰物质（生理物质或药物）进行验证，评估可能产生的影响

Cobas® TaqMan® HCV V2.0的干扰物质验证

| | |
|---|--|
| 核苷酸逆转录酶和DNA聚合酶抑制剂 泰诺福韦 阿德福韦酯 | 非核苷酸逆转录酶抑制剂 依法韦仑 奈韦拉平 |
| 人体免疫缺陷病毒（HIV）蛋白酶抑制剂 阿扎那韦 沙奎那韦 利托那韦 洛匹那韦/利托那韦 奈非那韦 地瑞那韦 替拉那韦 磷沙那韦 | 核苷逆转录酶抑制剂 拉米夫定 齐多夫定 司他夫定 阿巴卡韦 地达诺新 恩曲他滨 恩替卡韦 替比夫定 |
| HIV融合抑制剂 恩夫韦地 | HIV进入抑制剂 马拉韦罗 |
| 治疗疱疹的化合物 更昔洛韦 缙更昔洛韦 阿昔洛韦 | 免疫调节剂 聚乙二醇干扰素-2b 利巴韦林 聚乙二醇干扰素-2a |
| HIV整合酶抑制剂 雷特格韦 | |

Cobas® TaqMan® HBV V2.0的干扰物质验证

| | |
|---|--|
| 核苷酸逆转录酶和DNA聚合酶抑制剂 替诺福韦 阿德福韦酯 替比夫定 | 非核苷酸逆转录酶抑制剂 依法韦仑 奈韦拉平 |
| 人体免疫缺陷病毒（HIV）蛋白酶抑制剂 沙奎那韦 利托那韦 洛匹那韦/利托那韦 安泼那韦 印地那韦 | 核苷逆转录酶抑制剂 拉米夫定 齐多夫定 司他夫定 阿巴卡韦 地达诺新 恩替卡韦 |
| HIV融合抑制剂 恩夫韦地 | HIV进入抑制剂 马拉韦罗 |
| 治疗疱疹的化合物 更昔洛韦 缙更昔洛韦 阿昔洛韦 | 免疫调节剂 聚乙二醇干扰素-2b 利巴韦林 聚乙二醇干扰素-2a |
| 抗抑郁药 盐酸帕罗西汀 佛西汀 舍取林 | |

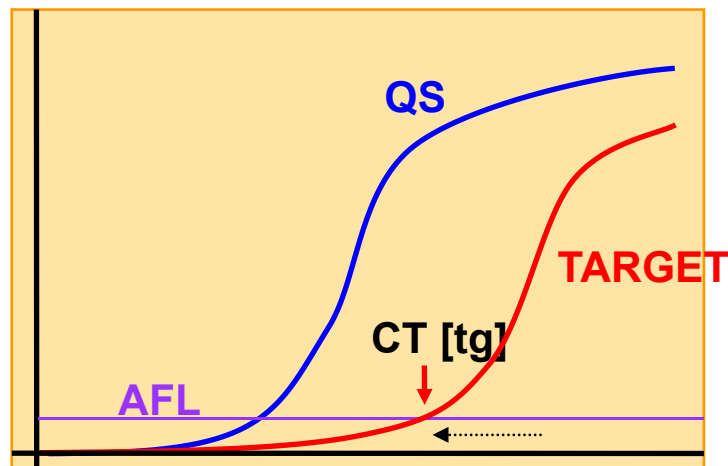
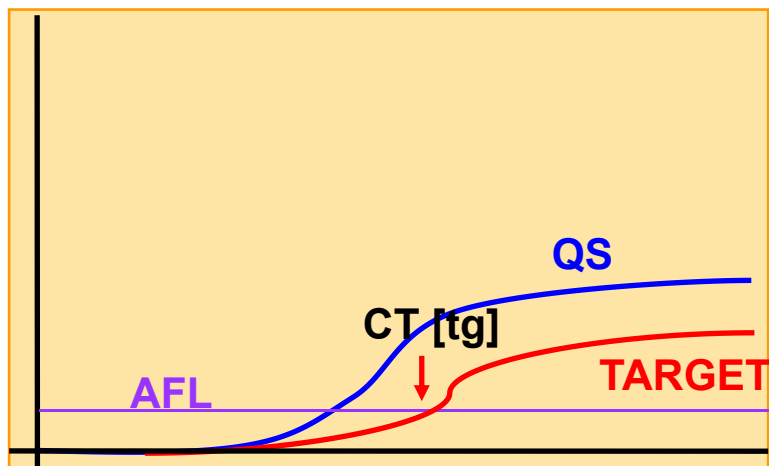
上表中药物化合物在峰值血浆浓度（C_{max}）和三倍C_{max}时不会对通过Cobas® TaqMan HBV/HCV定量检测试剂盒的定量结果产生干扰

1. Cobas AmpliPrep_Cobas TaqMan HBV test-version 2.0中文说明书
2. Cobas AmpliPrep_Cobas TaqMan HCV quantitative test-version 2.0中文说明书

干扰是造成分析误差的重要原因

应对干扰方案：

- ✓ 校正或补偿，使标本中的干扰效应减少到最低
- ✓ **罗氏独有内标定量**：在每份检测样本中加入已知浓度的HBV/HCV定量标准品（HBV/HCV QS）进行定量检测



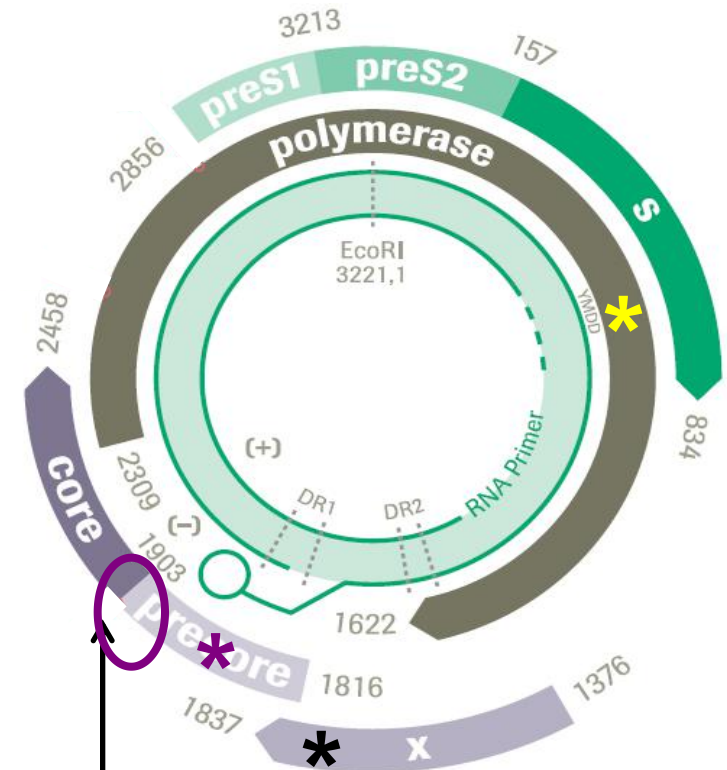
- ✓ 样本提取和PCR 抑制的质控
- ✓ 补偿PCR 效率差异
- ✓ 无需外部校准曲线，校正管间差异

HBV DNA定量检测的临床挑战

高遗传多样性:

- 多基因型A-J型
- 易于突变
 - 野生株变异: Precore 突变
 - 药物导致变异: YMDD突变

选择合适的引物和探针是保证检测能力的关键¹



靶标, 这个基因组的扩增区不受耐药导致的突变影响

1. Yu Y, et al. Biotechnol Bioeng, 2005;89:670-679

2. Hunt C.M., et al. Hepatology 2000;31:1037-1044.

Cobas® TaqMan HBV 独特引物和探针设计

- 选择高保守区域，不受耐药导致的突变影响

在A-H基因型/前C区突变样本中表现出优秀的检测性能¹

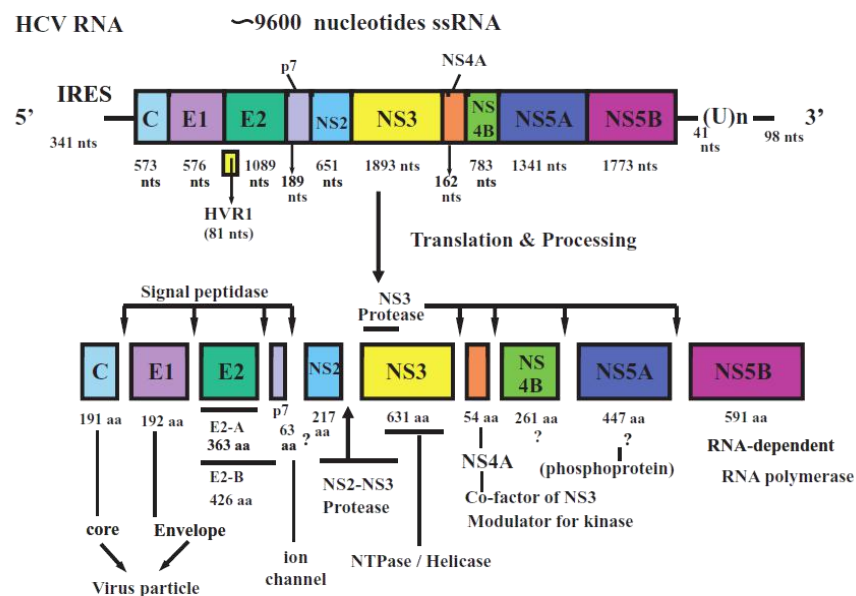
| 基因型 | 基质 | 95% PROBIT 阳性率 浓度 批次1 | 95% PROBIT 阳性率 浓度批次2 |
|-------|----|--------------------------|-------------------------|
| A | 血浆 | 10.6 | <5.0 |
| | 血清 | 10.4 | 5.5 |
| B | 血浆 | 5.6 | 5.5 |
| | 血清 | 5.8 | 16.4 |
| C | 血浆 | 5.8 | 5.8 |
| | 血清 | 14.8 | 10.9 |
| D | 血浆 | 5.9 | 10.4 |
| | 血清 | 5.6 | 9.8 |
| E | 血浆 | 13.1 | 6.1 |
| | 血清 | 6.3 | 15.7 |
| F | 血浆 | 4.9 | 5.8 |
| | 血清 | 6.0 | 5.9 |
| G | 血浆 | 12.3 | 5.9 |
| | 血清 | 5.8 | 11.6 |
| H | 血浆 | 9.8 | 5.5 |
| | 血清 | 11.6 | 11.2 |
| 前C区突变 | 血浆 | 10.4 | 11.2 |
| | 血清 | 5.8 | 12.2 |

HCV 病毒定量检测的临床挑战

- **高复制率** ~ 10^{12} 个病毒/天
- **高度变异** ~ 突变株占总体的9.12%
- 高度保守区5'UTR是大多数HCV检测的靶点
，已发现5'UTR也存在核苷酸变异和多态性
- HCV RNA核酸检测依赖于模板和PCR引物/探针之间的杂交，若使用单一探针，**可能因错配显著降低病毒的检出和定量效能**

HCV基因组结构

HCV RNA正链 ~ 9600个核苷酸



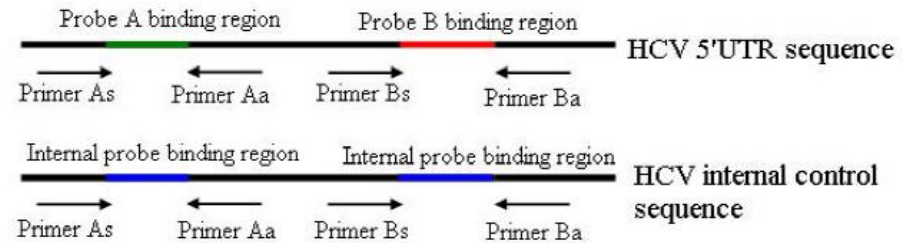
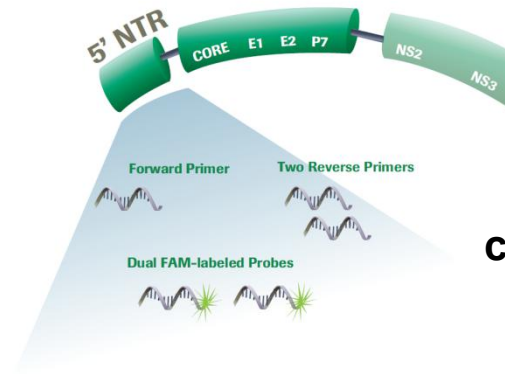
1. Chayama K, et al. J Gastroenterol Hepatol. 2011;26(S1):83-95.

2. 李金明. 中华检验医学杂志2010;33(10):901-904

Cobas® TaqMan HCV双探针设计，提高检测性能

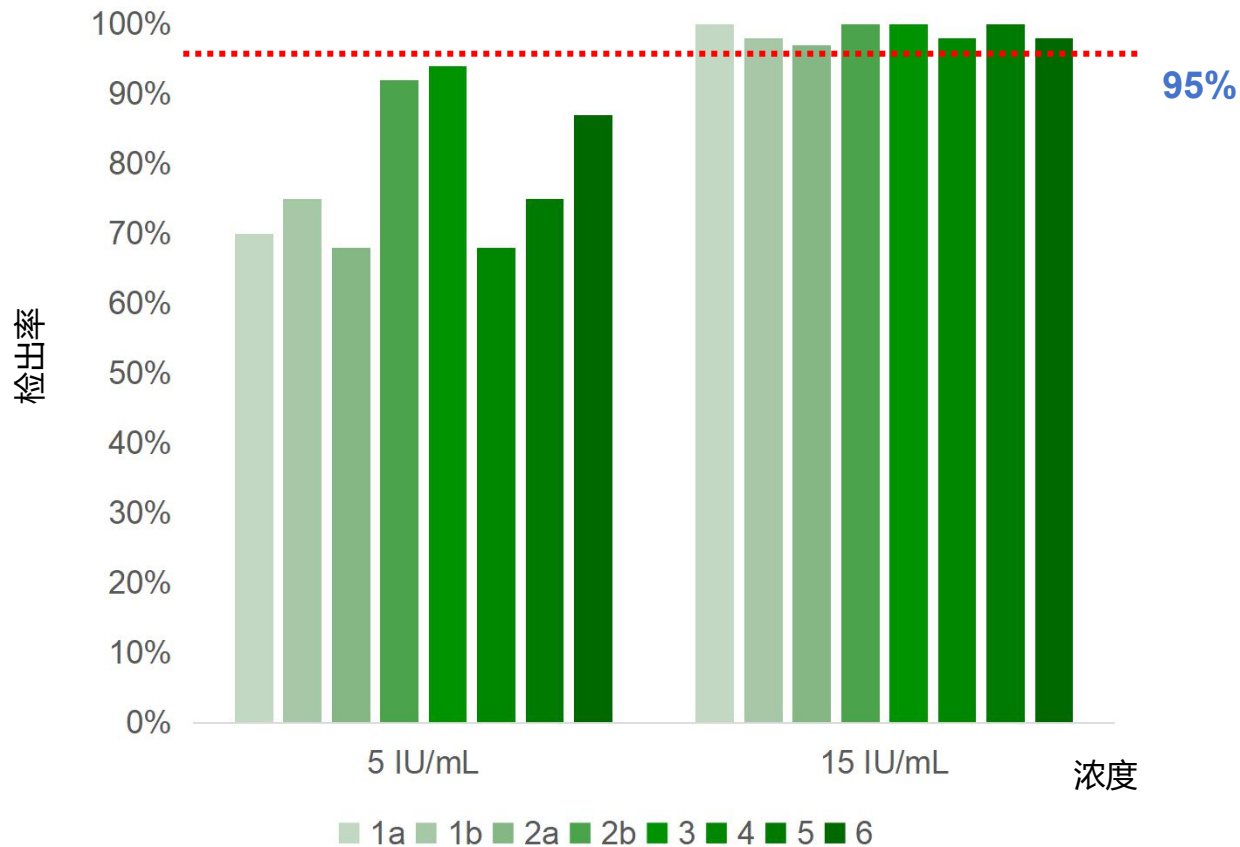
HCV RNA检测

- 双探针交替匹配
- 有效弥补基因4型漏检的问题
- 准确评估HCV载量，提高检测效能



Cobas® TaqMan HCV 实现全基因型检测

- Cobas HCV对15IU/ml的8种不同基因型HCV RNA, 检出率≥95%

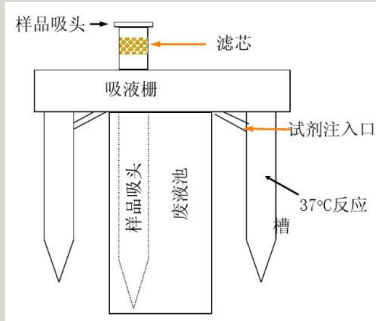


EDTA血浆HCV RNA基因型检出限的验证

PCR检测的挑战：交叉污染

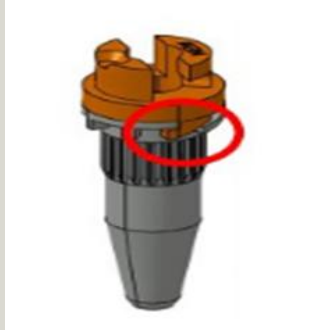
- Cobas® AmpliPrep三重设计, 减少交叉污染

独立样本处理单元



vs. 开放样本架

锁合样品管



vs. 胶带密封

试剂匣



vs. 试剂槽

VS.

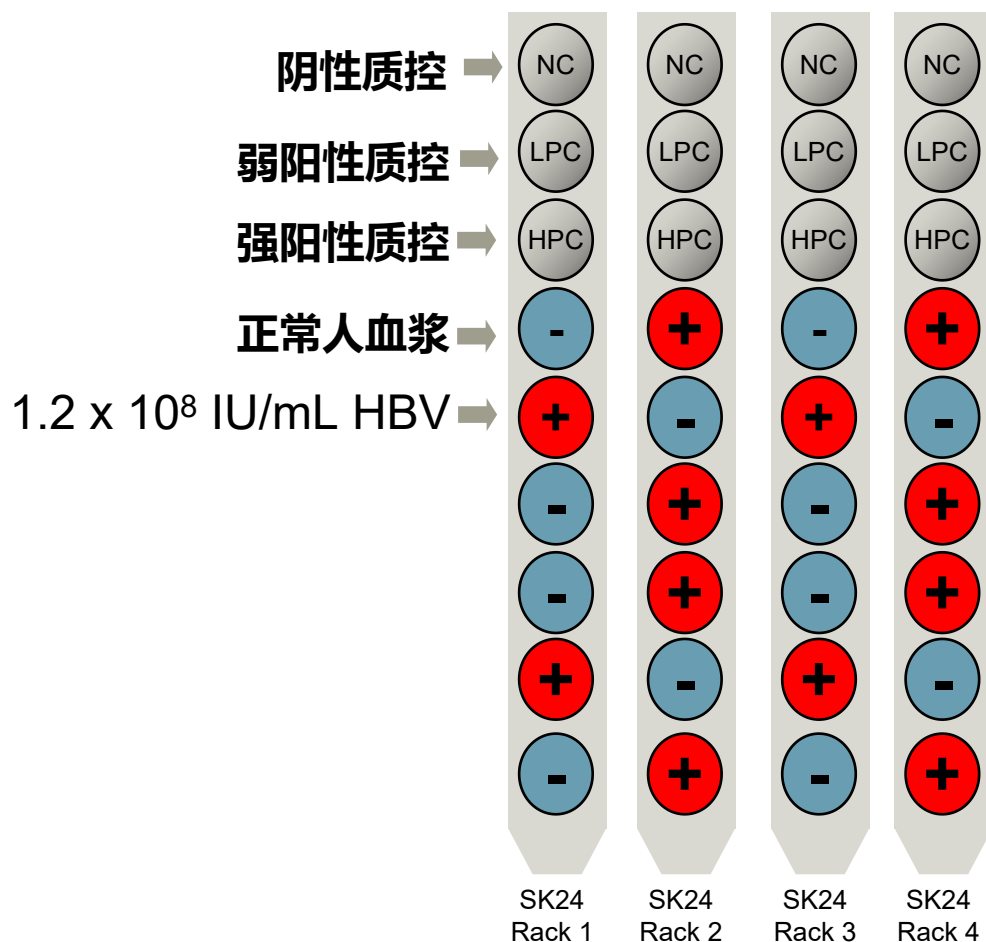


各个小孔之间不独立
容易交叉污染

Cobas® AmpliPrep防交叉污染设计

- 提供可靠检测结果

棋盘试验显示**零**交叉污染率

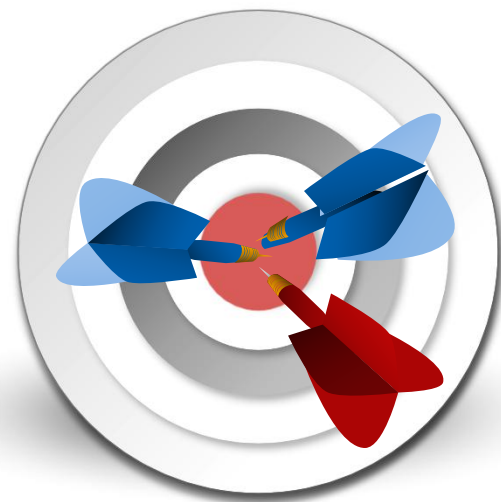


结果
所有的阴性质控和正常
人血浆报告
为
“Target Not Detected”

4 × 24 样本,
连续检测5批次

Cobas® AmpliPrep/cobas® TaqMan 全自动核酸分离纯化及PCR分析系统

- ✓ 检测性能可靠，更好满足临床需要
- ✓ cobas® TaqMan HBV 独特引物和探针设计
 - 不受耐药导致的突变影响
- ✓ cobas® TaqMan HCV双探针设计，
 - 提高检测性能，实现全基因型检测
- ✓ 三重防交叉污染设计，提供可靠检测结果



Cobas® AmpliPrep/cobas® TaqMan系统： 高灵敏检测，更好满足临床需求

| | cobas TaqMan HBV DNA v2.0 | cobas TaqMan HCV RNA v2.0 |
|------|----------------------------|---------------------------|
| 灵敏度 | 20 IU/mL | 15 IU/mL |
| 定量方法 | 内部定量标准品法 | |
| 自动化 | 全自动 | |
| 可溯源性 | WHO标准品 | |
| 基因型 | 涵盖亚型：A-H 加强pre-core突变检测 | G1-6 |

产品名称：乙型肝炎病毒核酸检测试剂盒（PCR-荧光法）

注册证号：国械注进20143405378

生产企业：Roche Molecular Systems, Inc.

产品名称：丙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒（PCR-荧光法）

注册证号：国食药监械（进）字2014第3401702号

生产企业：Roche Molecular Systems, Inc.

***Doing now what patients need
next***