

• 论著-临床研究 •

HBV DNA 超敏定量检测试剂盒的性能验证

肖圣达¹ 耿帆¹ 徐远东¹ 陈凤花¹

[摘要] 目的:验证天隆 HBV DNA 超敏定量检测试剂盒在 cobas[®] Z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪上的检测性能,以评估其是否满足临床应用要求。方法:参考 CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》和 CNAS-CL02-A009《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》等相关文件,应用临床血清样本和 HBV DNA 国家标准物质以及 WHO 国际标准物质,对精密度、正确度、线性范围、定量限、检出限、抗干扰能力、交叉污染、试剂批间差异、核酸室温放置时间等性能进行验证。结果:该系统检测 10^2 、 10^3 、 10^6 IU/mL 混合血清样本的重复性精密度分别为 2.60%、2.43%、0.91%,中间精密度分别为 4.41%、3.36%、2.48%;HBV DNA 国家标准物质 GBW(E)090586(200 IU/mL)、GBW(E)090137(1.41×10^3 IU/mL)和 GBW(E)090139(4.60×10^6 IU/mL)的实测值与靶值差异均在 $\pm 0.4 \text{ Log}_{10}$ IU/mL 范围内;该系统在 $2.32 \times 10^1 \sim 2.32 \times 10^9$ IU/mL 范围内呈线性(线性回归方程为 $Y=0.993 2X+0.161 2$, $R^2=0.998 9$);该系统的定量限为 30 IU/mL,检出限为 10 IU/mL;干扰物质总胆红素(Tb)浓度 $\leq 512 \mu\text{mol/L}$ 、血红蛋白(Hb)浓度 $\leq 10 \text{ g/L}$ 、甘油三酯(TG)浓度 $\leq 18 \text{ mmol/L}$ 时,均对检测结果没有明显影响(偏倚 $< \pm 7.5\%$);交叉防污染实验中阳性标本检出率为 100%,阴性标本检出率为 0,全部阴性样本未受污染;不同批次试剂间检测结果差异符合要求(偏倚 $< \pm 7.5\%$);磁珠法提取的核酸室温放置 2 h,再进行加样扩增,对检测结果没有明显影响(偏倚 $< \pm 7.5\%$)。结论:天隆 HBV DNA 超敏定量检测试剂盒在全自动荧光定量 PCR 仪 cobas[®] Z480 上的检测性能基本符合临床应用要求。

[关键词] 乙型肝炎病毒 DNA 定量;磁珠法;实时荧光定量 PCR;性能验证

DOI:10.13201/j.issn.1004-2806.2021.02.001

[中图分类号] R512.6 [文献标志码] A

Performance verification of a hepatitis B virus DNA ultra-sensitive quantification kit

XIAO Shengda GENG Zhi XU Yuandong CHEN Fenghua

(Department of Clinical Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science Technology, Wuhan, 430022, China)

Correspondence author: CHEN Fenghua, E-mail: chfh100@126.com

Abstract Objective: To verify the detection performance of Tianlong HBV nucleic acid ultra-sensitive quantification kit on cobas[®] Z480 automated quantitative PCR thermocycler and assess whether it meets clinical application requirements. **Methods:** According to CNAS-GL039 "Guidance on the Performance Verification for Molecular Diagnostic Procedures" and CNAS-CL02-A009 "Guidance on the Application of Accreditation Criteria for the Medical Laboratory Quality and Competence in the Field of Molecular Diagnostics", clinical serum samples, HBV DNA national serum standard materials and WHO international standard were used to verify the precision, accuracy, linear range, quantitative limit, detection limit, anti-interference ability, cross-contamination, reagent batch difference and nucleic acid room temperature placement time. **Results:** The repeatability precision of the system at 10^2 , 10^3 and 10^6 IU/mL was 2.60%, 2.43%, and 0.91%, respectively, and the intermediate precision was 4.41%, 3.36%, and 2.48%, respectively. The differences between the expected and tested concentrations of the HBV DNA national standards including GBW(E) 090586 (200 IU/mL), GBW(E) 090137 (1.41×10^3 IU/mL), and GBW(E) 090139 (4.60×10^6 IU/mL) were all within 0.4 Log_{10} IU/mL. The linearity range was $2.32 \times 10^1 \sim 2.32 \times 10^9$ IU/mL, and the linear regression equation was $Y=0.993 2X+0.161 2$, $R^2=0.998 9$. The detection limit of the system was 10 IU/mL, and its limit of quantification was 30 IU/mL. When the concentration of hemoglobin(Hb) was less than 10 g/L, total bilirubin(Tb) was less than $512 \mu\text{mol/L}$, and triglyceride(TG) was less than 18 mmol/L, there was no effect on the detection results(bias $< \pm 7.5\%$). There was no cross-contamination during the "checkerboard" test. The detection differences between different batches of the kits met the requirements(bias $< \pm 7.5\%$). When the nucleic acid extracted by the magnetic bead method was placed at room temperature for 2 hours, there was no effect on the detection results(bias $< \pm 7.5\%$). **Conclusion:** The detection performance of the Tianlong HBV nucleic acid quantification kit on the cobas[®] Z480 automated quantitative PCR ther-

¹华中科技大学同济医学院附属协和医院检验科(武汉,430022)
通信作者:陈凤花,E-mail:chfh100@126.com

mocycler basically can meet clinical application requirements.

Key words hepatitis B virus DNA quantification; magnetic bead method; real-time fluorescent quantitative PCR; performance verification

据估计目前全球约有 2.92 亿 HBsAg 阳性的 HBV 感染者,其中我国约有 8600 万^[1]。我国肝硬化和肝细胞癌患者中,由 HBV 感染引起的比例分别为 77% 和 84%^[2]。血清中高水平 HBV DNA 已被确定为肝硬化和肝细胞癌的主要危险因素^[3]。经抗病毒治疗抑制 HBV DNA,是预防和延缓慢性 HBV 感染者发展为肝硬化、终末期肝病和肝细胞癌的重要举措。敏感、准确定量 HBV DNA 在确定治疗指征、治疗终点、监测治疗反应以及早期识别耐药中起着重要的作用^[4]。国际肝病协会关于 HBV DNA 超敏定量检测试剂的要求包括灵敏度 10~15 IU/mL、线性范围 1~9 log₁₀ IU/mL、特异性强和重复性佳等^[5]。目前我国市场上已有多种获国家药品监督管理局(NMPA)批准的商品化 HBV DNA 超敏定量检测试剂,临床实验室应验证试剂检测性能,根据临床应用要求选择合适的试剂具有重要的临床意义。

根据 CNAS-CL02《医学实验室质量和能力认可准则》、CNAS-GL037《临床化学定量检验程序性能验证指南》、CNAS-GL039《分子诊断检验程序性能验证指南》、CNAS-CL02-A009《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》等相关卫生行业标准以及美国临床和实验室标准化研究院(CLSI)EP 系列相关文件,本实验室制定了针对天隆公司的 HBV DNA 超敏定量检测试剂盒的性能验证方案,包括精密度、正确度、线性范围、定量限、检出限、抗干扰能力、交叉污染的验证,并根据临床情况补充了试剂批间差异、核酸放置实验等验证方案,以便对该试剂的检测性能进行综合评判。

1 材料与amp;方法

1.1 标本来源

收集 2019 年 5 月收治的慢性 HBV 感染者以及健康体检者血清各若干份,制备成不同浓度的混合血清。HBV DNA 血清标准物质 GBW(E)090586 (S7:200 IU/mL,批号 201905002)、GBW(E)090137 (S5:1.41×10³ IU/mL,批号 201904001)和 GBW(E)090139 (S2:4.60×10⁶ IU/mL,批号 201904001),购自北京康彻思坦生物技术有限公司。HBV DNA 第 4 次 WHO 国际标准物质(9.55×10⁵ IU/mL,编号 10/266),购自英国国家生物学标准和质控物研究所(national institute for biological standards and control, NIBSC)。阴性对照及标准品为天隆 HBV 核酸定量检测试剂盒配套。

1.2 仪器与试剂

NP968-C 磁珠式核酸提取仪(苏州天隆生物科

技有限公司);Roche cobas®Z480 全自动荧光定量 PCR 分析仪(罗氏)。核酸提取试剂盒(苏州天隆生物科技有限公司);HBV 核酸定量检测试剂盒(PCR 荧光法,苏州天隆生物科技有限公司,批号为 P1011902001、P1011811005、P1011807004)。

1.3 方法

1.3.1 HBV DNA 定量检测 使用天隆公司核酸提取试剂盒在 NP968-C 磁珠式核酸提取仪上完成 200 μL 血清中的病毒核酸提取,在 Roche cobas®Z480 全自动荧光定量 PCR 仪进行扩增。所有步骤严格按照试剂说明书进行。反应体系为 40 μL (19.4 μL 反应混合液+0.6 μL Taq 酶+20 μL 模板),扩增条件:95℃ 预变性 3 min,然后 94℃ 变性 15 s、60℃ 退火延伸 30 s(采集 FAM 和 HEX 荧光),共 45 个循环。

1.3.2 性能验证方法 ①精密度验证。选择 3 个浓度水平(10²、10³ 和 10⁶ IU/mL)的混合血清样本进行精密度验证。重复性精密度验证:每个浓度水平的样本在同一批次内重复检测 20 次,计算均值、标准差和变异系数;中间精密度验证:每个浓度水平的样本分 5 个批次,每批重复检测 4 次,计算均值、标准差和变异系数。精密度均小于 5% 为评判标准;并且以我国 NCCL 室间质量评价标准 0.4 log₁₀ IU/mL 作为允许总误差(TEa),重复性精密度 < 3/5 TEa (0.24 log₁₀ IU/mL),重复性精密度验证通过;中间精密度 < 4/5 TEa (0.32 log₁₀ IU/mL),中间精密度验证通过。②正确度验证。选择 3 个浓度水平的国家标准物质(S7:200 IU/mL, S5:1.41×10³ IU/mL, S2:4.60×10⁶ IU/mL)进行正确度验证。每种国家标准物质重复检测 2 次,连续检测 5 d。计算各浓度水平的偏倚,偏倚在 ±0.4 log₁₀ IU/mL 范围内,为符合要求。③线性范围验证。根据试剂厂家声称的定量范围(30.0~1.0×10⁸) IU/mL,选取高浓度水平的混合血清样本(>10⁹ IU/mL),使用混合阴性血清将其依次梯度稀释为 10⁸、10⁷、10⁶、10⁵、10⁴、10³、10²、10¹,共计 9 个浓度。每个浓度样本重复检测 3 次,取各浓度检测结果的均值,与预测值进行线性回归分析,计算回归方程 Y=a+bX。R² ≥ 0.98, a 趋近于 0, b 位于 0.97~1.03,为符合要求。④定量限验证。根据试剂厂家声称的定量下限 30 IU/mL,选取 HBV DNA 第 4 次 WHO 国际标准物质(9.55×10⁵ IU/mL),使用混合阴性血清将样本梯度稀释至 30 IU/mL,重复检测 20 次。检测结果全部符合实测值与靶值差在 ±0.4 log₁₀ IU/mL 内,且 s < 0.24 log₁₀ IU/mL,

定量限验证通过。⑤检出限验证。根据试剂厂家声称的检出限 10 IU/mL,选取 HBV DNA 第 4 次 WHO 国际标准物质(9.55×10^5 IU/mL),使用混合阴性血清将样本梯度稀释至 10 IU/mL。重复检测 20 次,检出率 $\geq 95\%$,检出限验证通过。⑥抗干扰能力验证。选择高、低浓度水平(10^6 和 10^3 IU/mL)的混合血清样本进行抗干扰能力验证。分别将 1 倍体积的干扰物质参考品 G1 含总胆红素(10.24 mmol/L)、G2 含血红蛋白(200 g/L)、G3 含甘油三酯(360 mmol/L)加入到 19 倍体积的各浓度水平的混合血清样本中,制备成分别含总胆红素 512 μ mol/L、血红蛋白 10 g/L、甘油三酯 18 mmol/L 的混合血清样本。同时将 1 倍体积的去离子水加入到 19 倍体积的各浓度水平的混合血清样本中作为对照。每样本各检测 3 次,取平均值,含干扰物质的样本与对照样本的检测结果偏倚在 $\pm 7.5\%$ 内,抗干扰验证通过。⑦防交叉污染能力验证。选取高浓度($>10^7$ IU/mL)的混合血清样本和阴性混合血清样本,将阴、阳性样本进行棋盘法交叉加样,一共做 2 块提取板(32 个样本)。阳性样本检出率为 100%,阴性样本检出率为 0,则证明实验无携带污染,验证通过。⑧试剂批间差异验证。选取覆盖测量区间的 6 个临床血清样本(包含阴性、临界值、低值、中值和高值),应用 3 个不同批号试剂分 3 批次进行检测,每个批号各进行一次检测,计算各批号结果间的偏倚,批间偏倚 $< \pm 7.5\%$,验证通过。⑨核酸室温放置时间验证。选取覆盖测量区间的 9 个混合血清样本(阴性、 $10^1 \sim 10^8$ 每个数量级浓度水平各 1 个),将样本核酸提取完成后立即加样上机所测结果作为对照组;将样本核酸提取完成后室温放置 2 h 再进行加样上机所测结果作为实验组,每个样本做 3 个复孔;计算对照组和实验组间的偏倚,偏倚 $< \pm 7.5\%$ 则说明核酸可在常温至少放置 2 h 而对检测结果无明显影响。

1.4 质量控制

所有检测均由有资质的实验人员严格按照试剂说明书(SOP)进行。每批次均做阴性对照和 S5(靶值 1.41×10^3 IU/mL)、S2(靶值 4.60×10^6 IU/mL)2 个浓度水平的 HBV DNA 血清标准物质。结果判读严格按照试剂说明书进行,并确保质控在控后再进行结果分析。

1.5 统计学方法

所有结果进行以 10 为底的对数转换后再进行统计学分析,采用 Microsoft Excel 软件进行统计学分析。

2 结果

2.1 精密度评估结果

HBV DNA 定量检测精密度评估结果见表 1。

10^2 、 10^3 、 10^6 IU/mL 浓度水平混合血清样本的重复性精密度分别为 2.60%、2.43%、0.91%;中间精密度分别为 4.41%、3.36%、2.48%。符合行业标准 YY/T 1182—2010《核酸扩增检测用试剂(盒)》定量试剂精密度变异系数(CV) $\leq 5\%$ 的要求;以我国 NCCL 室间质量评价标准 $0.4 \log_{10}$ IU/mL 作为允许总误差(TEa),满足重复性精密度 $< 3/5 TEa$ ($0.24 \log_{10}$ IU/mL),中间精密度 $< 4/5 TEa$ ($0.32 \log_{10}$ IU/mL)的要求。

表 1 HBV DNA 定量检测精密度评估结果

浓度水平/ (IU · mL ⁻¹)	重复性精密度		中间精密度	
	$\bar{x} \pm s$	CV/%	$\bar{x} \pm s$	CV/%
10^2	2.72 \pm 0.07	2.60	2.66 \pm 0.12	4.41
10^3	3.31 \pm 0.08	2.43	3.20 \pm 0.11	3.36
10^6	6.91 \pm 0.06	0.91	6.70 \pm 0.17	2.48

2.2 正确度评估结果

HBV DNA 定量检测正确度评估结果见表 2。3 个浓度水平[GBW(E)090586、GBW(E)090137、GBW(E)090139]的 HBV DNA 血清标准物质的实测值与靶值的差异均在 $\pm 0.4 \log_{10}$ IU/mL 范围内,符合要求。

表 2 HBV DNA 定量检测正确度评估结果 $\bar{x} \pm s$

样本	检测结果	靶值	允许范围
GBW(E)090586	2.25 \pm 0.21	2.30	1.90~2.70
GBW(E)090137	3.43 \pm 0.11	3.15	2.75~3.55
GBW(E)090139	6.75 \pm 0.17	6.66	6.26~7.06

2.3 线性范围评估结果

对 9 个浓度梯度的 HBV DNA 样本进行线性回归分析(图 1), $2.32 \times 10^1 \sim 2.32 \times 10^9$ IU/mL 范围内呈线性,线性回归方程为 $Y = 0.993 2X + 0.161 2$, $R^2 = 0.998 9$,厂家声称的定量线性范围($30.0 \sim 1.0 \times 10^8$ IU/mL)验证通过。

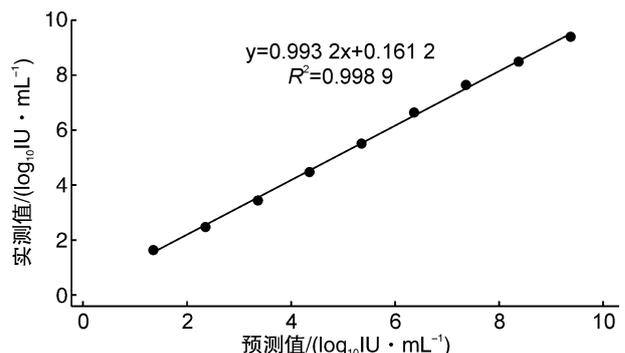


图 1 HBV DNA 定量检测线性范围评估结果

2.4 定量限评估结果

将 HBV DNA 第 4 次 WHO 国际标准物质 (9.55×10⁵ IU/mL)应用混合阴性血清梯度稀释至 30 IU/mL,重复检测 20 次,实测值与靶值差均在 ±0.4 log₁₀ IU/mL 内,检测均值为 1.34 log₁₀ IU/mL, s 为 0.11 log₁₀ IU/mL,符合 s<0.24 log₁₀ IU/mL,定量限验证通过。

2.5 检出限评估结果

将 HBV DNA 第 4 次 WHO 国际标准物质 (9.55×10⁵ IU/mL)应用混合阴性血清梯度稀释至 10 IU/mL,重复检测 20 次,其中 19 次检出,1 次未检出,检出率为 95%,厂家声称的 10 IU/mL 检出限验证通过。

2.6 抗干扰能力评估结果

HBV DNA 定量检测抗干扰能力评估结果见表 3。含干扰物质的样本与对照样本的结果偏倚均<±7.5%,表明干扰物质总胆红素(Tb)浓度≤512 μmol/L、血红蛋白(Hb)浓度≤10 g/L、甘油三酯(TG)浓度≤18 mmol/L 时,对检测结果没有明

显影响。

2.7 防交叉污染能力评估结果

阴、阳性样本交叉进行检测时,阳性标本检出率为 100%,阴性标本检出率为 0。全部阴性样本未受污染,表明无携带污染。

2.8 试剂批间差异评估结果

HBV DNA 定量检测试剂批间差异评估结果见表 4。覆盖测量区间的 6 个临床血清样本,应用不同批号试剂检测结果的偏倚均<±7.5%,符合 CNAS-CL02-A009《医学实验室质量和能力认可准则在分子诊断领域的应用说明》中关于试剂批间差异的要求。

2.9 核酸室温放置时间评估

核酸提取后室温放置时间评估结果见表 5。覆盖测量区间的 9 个混合血清样本(阴性、10¹~10⁸ 每个数量级浓度水平各 1 个),核酸提取放置 2 h 后进行检测的结果与核酸未放置进行检测的结果偏倚均<±7.5%,能够满足临床要求。

表 3 HBV DNA 定量检测抗干扰能力评估结果

组别	IU/mL, $\bar{x} \pm s$					
	Tb(512 μmol/L)		Hb(10 g/L)		TG(18 mmol/L)	
	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶	10 ³	10 ⁶
对照组	3.20±0.06	6.69±0.06	3.20±0.06	6.69±0.06	3.20±0.06	6.69±0.06
干扰组	2.99±0.05	6.58±0.01	2.99±0.03	6.48±0.06	3.19±0.06	6.74±0.01
偏倚/%	-6.56	-1.64	-6.56	-3.14	-0.31	0.75

表 4 HBV DNA 定量检测试剂批间差异评估结果

样本号	P1011902001(A)	P1011811005(B)	P1011807004(C)	A vs B 偏倚/%	B vs C 偏倚/%	A vs C 偏倚/%
1	0	0	0	0	0	0
2	3.52	3.49	3.74	-0.85	7.16	6.25
3	5.31	5.42	5.62	2.07	3.69	5.84
4	6.43	6.49	6.70	0.93	3.24	4.20
5	8.50	8.31	8.46	-2.24	1.81	-0.47
6	8.61	8.41	8.48	-2.32	0.83	-1.51

表 5 HBV DNA 定量检测核酸室温放置时间评估结果

样本号	$\bar{x} \pm s$		
	实时检测结果	放置 2 h 检测结果	偏倚/%
1	0±0	0±0	0
2	1.92±0.12	2.01±0.06	4.69
3	2.42±0.11	2.46±0.12	1.65
4	3.24±0.09	3.36±0.06	3.70
5	4.23±0.07	4.32±0.09	2.13
6	5.19±0.06	5.28±0.10	1.73
7	6.20±0.04	6.24±0.03	0.65
8	7.24±0.01	7.30±0.06	0.83
9	8.04±0.11	8.12±0.08	1.00

3 讨论

慢性 HBV 感染者的精准管理高度依赖于 HBV DNA 的准确定量,而影响 HBV DNA 定量准确性的因素很多,包括核酸提取所用血清样本量、核酸提取方法、是否存在酶抑制剂、PCR 反应体系中模板浓度、PCR 引物和荧光探针等。这些因素在不同的商品化 HBV DNA 超敏定量检测试剂间可能存在差异,从而可能改变病毒载量结果、影响临床决策。因此,验证 HBV DNA 超敏定量检测试剂的性能极其必要。

天隆 HBV DNA 超敏定量检测试剂盒,结合配套的半自动化磁珠式核酸提取仪进行核酸提取,

在 cobas® Z480 全自动荧光定量 PCR 仪进行扩增检测。根据中国合格评定国家认可委员会 (CNAS) 以及美 CLSI EP 系列等相关文件,本实验室制定了性能验证方案。

该试剂在 10^2 、 10^3 、 10^6 IU/mL 的重复性精密度和中间精密度均能满足 $CV \leq 5\%$,符合厂家声明的精密密度,以我国 NCCL 室间质量评价标准 $0.4 \log_{10}$ IU/mL 作为允许总误差 (TEa),重复性精密密度 $< 3/5 TEa$ ($0.24 \log_{10}$ IU/mL),中间精密度 $< 4/5 TEa$ ($0.32 \log_{10}$ IU/mL);该试剂在 10^2 、 10^3 、 10^6 IU/mL 三个水平国家标准物质的实测值与其靶值的差值均小于 $\pm 0.4 \log_{10}$ IU/mL,符合我国 NCCL 室间质量评价标准 HBV DNA 定量检测的可接受范围为靶值 $\pm 0.4 \log_{10}$ IU/mL;该试剂的精密度和正确度满足临床应用要求。本研究中用于线性范围验证的样本覆盖了厂家声明的线性范围 ($30.0 \sim 1.0$) $\times 10^8$ IU/mL, $R^2 > 0.99$,提示样本浓度在 $2.32 \times 10^1 \sim 2.32 \times 10^9$ IU/mL 范围内具有良好的线性关系,线性范围验证通过。

该试剂应用磁珠法提取核酸后结合 Taqman 实时荧光 PCR 定量检测血清样本中 HBV DNA,将 WHO 国际标准物质稀释至厂家声称的定量限 30 IU/mL,进行 20 次检测后实测值与靶值差均在 $\pm 0.4 \log_{10}$ IU/mL 内,且 $s < 0.24 \log_{10}$ IU/mL;将 WHO 国际标准物质稀释至厂家声称的检出限 10 IU/mL,进行 20 次检测其检出率为 95%;将阴性样本和高浓度的阳性样本交叉进行检测时,全部阴性样本无扩增,阳性标本检出率为 100%,无交叉污染。因此该试剂定量下限可达 30 IU/mL,检出限为 10 IU/mL,防交叉污染验证符合要求。

由于临床血清样本中存在 PCR 抑制剂如血红蛋白等,可能抑制 PCR 扩增,从而影响 HBV DNA 定量结果,因此需要验证厂家声称的试剂抗干扰能力。本研究中当样本所含 Tb 低于 $512 \mu\text{mol/L}$, Hb 低于 10 g/L, TG 低于 18 mmol/L 时,含干扰

物质的样本与对照样本的检测结果偏倚均在 $\pm 7.5\%$ 内,提示该试剂有强的抗干扰能力,一定程度溶血、黄疸、脂血对结果没有明显影响。

另外在临床日常工作中,可能出现应用不同批号试剂检测或核酸提取后不能及时上机扩增的情况,因此本研究增加了实验评估试剂批间差异和核酸室温放置时间,发现不同批号试剂定量检测结果的偏倚、以及其核酸提取后室温放置 2 h 与核酸提取后未放置的检测结果偏倚均小于 $\pm 7.5\%$,验证通过。

综上所述,天隆 HBV DNA 超敏定量检测试剂盒在 cobas® Z480 荧光定量 PCR 仪上的检测精密密度、正确度、线性范围、定量限、检出限、抗干扰能力、交叉污染、试剂批间差异、核酸室温放置时间等性能基本符合临床应用要求。

参考文献

- [1] Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016; a modelling study[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2018, 3(6): 383-403.
- [2] 中华医学会感染病学分会, 中华医学肝病学分会. 慢性乙型肝炎防治指南 (2019 年版)[J]. 临床肝胆病杂志, 2019, 35(12): 2648-2661.
- [3] Chen CF, Lee WC, Yang HI, et al. Changes in serum levels of HBV DNA and alanine aminotransferase determine risk for hepatocellular carcinoma[J]. Gastroenterology, 2011, 141(4): 1240-1248, 1248. e1-e2.
- [4] European Association for the Study of the Liver. Electronic address: easloffice@easloffice.eu; European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection[J]. J Hepatol, 2017, 67(2): 370-398.
- [5] Caliendo AM, Valsamakis A, Bremer JW, et al. Multi-laboratory evaluation of real-time PCR tests for hepatitis B virus DNA quantification[J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(8): 2854-2858.

(收稿日期: 2020-09-17)