

乙型肝炎病毒RNA检测试剂国家参考品的研制

郝晓甜, 刘艳, 李克坚*, 周诚* (中国食品药品检定研究院, 北京 100050)

摘要 **目的:** 研制乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) RNA检测试剂国家参考品并制定其质量标准。**方法:** 收集并筛选HBV RNA阳性和阴性血浆样本, 制备HBV RNA候选参考品。采用不同企业的试剂进行协作标定, 根据协作标定结果确定参考品的组成及制定质量标准, 并考察其均匀性和稳定性。**结果:** HBV RNA检测试剂国家参考品由10份阳性参考品, 10份阴性参考品, 1份精密度参考品和1份灵敏度参考品组成。其质量标准: 阳性参考品符合率为10/10; 阴性参考品符合率为10/10; 精密度参考品稀释10倍后重复检测10次, 要求 $CV \leq 5\%$; 最低检测限不高于 $2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。该参考品均匀性符合要求, 室温 (25 °C) 放置3 d、反复冻融3次均未影响参考品的稳定性。**结论:** 研制了首批HBV RNA检测试剂国家参考品并制定了质量标准, 为相关试剂的质量控制和评价提供依据。

关键词: 乙型肝炎病毒RNA; 检测试剂; 参考品; 质量标准

中图分类号: R917 文献标识码: A 文章编号: 1002-7777(2023)04-0396-08

doi:10.16153/j.1002-7777.2023.04.005

Development of National Reference Panel for Hepatitis B Virus RNA Detection Reagents

Hao Xiaotian, Liu Yan, Li Kejian*, Zhou Cheng* (National Institutes for Food and Drug Control, Beijing 100050, China)

Abstract Objective: To develop the national reference panel for hepatitis B virus (HBV) RNA detection reagents and establish its quality standard. **Methods:** HBV RNA positive and negative plasma samples were collected and screened to develop HBV RNA candidate reference materials. Collaborative calibration was carried out with the reagents from various manufacturers. According to the results of collaborative calibration, the composition and quality standard of reference materials were determined. Meanwhile, the homogeneity and stability of the national reference panel were well studied. **Results:** The national reference panel for HBV RNA detection reagents consists of 10 positive samples, 10 negative samples, 1 precision sample and 1 sensitivity sample. Its quality standard was as follows: the coincidence rate of positive samples was 10/10; the coincidence rate of negative samples was 10/10; the precision sample needs to be diluted 10 times and then be tested 10 times, and $CV \leq 5\%$ is required; the minimum detection limit is not higher than $2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$. The homogeneity of the reference met the requirements, and the stability of the reference was not affected after being placed at room temperature (25°C) for 3 d and repeated freezing and thawing three times. **Conclusion:** The first batch of national reference panel for HBV RNA detection reagents has been developed, and the related quality standard has been

基金项目: 国家科技重大专项 (编号 2018ZX10102001)

作者简介: 郝晓甜 Tel: (010) 67095448; E-mail: haoxiaotian@nifdc.org.cn

通信作者: 李克坚 Tel: (010) 67095614; E-mail: kejianli@nifdc.org.cn

周诚 Tel: (010) 67095357; E-mail: zhoucheng@nifdc.org.cn

established, which provides a basis for quality control and evaluation of related reagents.

Keywords: hepatitis B virus RNA; detection reagents; reference panel; quality standard

乙型肝炎病毒 (Hepatitis B Virus, HBV) 属于嗜肝DNA病毒科 (*hepadnaviridae*), 为部分双链环状DNA病毒, 基因组全长约3.2 kb^[1]。HBV感染呈世界性流行, 是全球慢性肝病和死亡的重要原因^[2]。据WHO报道, 全球约有2.57亿慢性HBV感染者^[3]。目前, 核苷(酸)类药物 (Nucleosides and Nucleotides Analogs, NAs) 广泛用于治疗慢性乙型肝炎 (Chronic Hepatitis B, CHB) 患者^[4], 但是不能清除肝细胞内的共价闭环状DNA (Covalently Closed Circular DNA, cccDNA), 停药后会发病毒学反弹和疾病复发^[5-6]。研究证实, 血清中HBV RNA仅由cccDNA产生, 与肝细胞内cccDNA 转录活性相关^[7-8]。因此, HBV RNA定量检测在评估持续性病毒感染及NAs停药后复发风险方面值得深入研究。

近年来, 随着人们对HBV RNA研究的不断深入, HBV RNA定量检测作为一种新型检测手段已被广泛地应用于HBV的实验室诊断^[9], 越来越多的HBV RNA定量检测试剂出现在国内市场。因此, 亟需研制HBV RNA检测试剂国家标准物质对相关试剂的研制技术及产品质量进行规范。由于尚无HBV RNA国际标准物质, 本研究在HBV RNA检测试剂国家标准品 (批号: 340008-201901)^[10]的研制基础上, 建立一套适用于PCR-荧光探针法和RNA捕获探针法的HBV RNA检测试剂国家参考品, 包括阳性参考品、阴性参考品、灵敏度参考品和精密度参考品, 用于对该类试剂进行质量控制和评价。

1 材料与仪器

1.1 原料血浆

HBV RNA参考品原料血浆来源于本科室从全国各地收集的大量临床人血浆样本。

1.2 HBV RNA标准品

HBV RNA标准品为HBV RNA检测试剂国家标准品, 批号为340008-201901, 浓度为 2.1×10^8 U · mL⁻¹。

1.3 试剂

乙肝五项检测试剂为美国Abbott公司生产的

乙型肝炎病毒表面抗原 (HBsAg)、乙型肝炎病毒表面抗体 (Anti-HBs)、乙型肝炎病毒e抗原 (HBeAg)、乙型肝炎病毒e抗体 (Anti-HBe) 和乙型肝炎病毒核心抗体 (Anti-HBc) 测定试剂盒 (化学发光微粒子免疫检测法)。核酸血筛试剂为美国Grifols Diagnostic Solutions Inc.公司生产的乙型肝炎病毒 (HBV)、丙型肝炎病毒 (HCV)、人类免疫缺陷病毒 (HIV) (1+2型) 检测试剂盒 (TMA-化学发光法)。HBV DNA定量试剂为美国Roche Diagnostics GmbH公司生产的乙型肝炎病毒核酸定量检测试剂盒 (PCR-荧光法)。HBV RNA初筛试剂为上海仁度生物科技有限公司生产的乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒 (RNA捕获探针法)、广州海力特生物科技有限公司生产的乙型肝炎病毒 (HBV) 前基因组RNA定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法)、湖南圣湘生物科技有限公司生产的乙型肝炎病毒核糖核酸 (HBV RNA) 定量检测试剂盒 (PCR-荧光探针法) 以及北京热景生物技术股份有限公司生产的乙型肝炎病毒pgRNA (HBV-pgRNA) 测定试剂盒 (PCR-荧光探针法)。均匀性和稳定性检测试剂为上海仁度生物科技有限公司生产的乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒 (RNA捕获探针法)。

1.4 仪器

仪器主要为美国Abbott GmbH Co.KG生产的全自动化学发光免疫分析仪, 型号: Alinity i; 美国Gen-Probe Incorporated公司生产的全自动核酸检测分析系统, 型号: Procleix Panther System; 美国Roche Diagnostics GmbH公司生产的全自动核酸提纯及医用PCR分析系统, 型号: cobas 8800 system。美国Life Technologies生产的ABI 7500荧光定量基因扩增仪。上海仁度生物科技有限公司生产的全自动核酸检测分析系统, 型号: Autosat。

2 方法

2.1 样品初筛

将本科室库存的大量临床人血浆样本分别进行乙肝五项 (HBsAg、Anti-HBs、HBeAg、Anti-HBe和Anti-HBc)、HBV/HCV/HIV核酸血筛以及

HBV DNA定量检测,并从中选择37份样品(随机编号R01~R37)分别采用上海仁度生物科技有限公司、广州海力特生物科技有限公司、湖南圣湘生物科技有限公司以及北京热景生物技术股份有限公司生产的HBV RNA检测试剂盒(随机编号1~4)测定HBV RNA浓度。

2.2 确定候选参考品

2.2.1 阳性候选参考品

从R01~R37选取HBV RNA为阳性且浓度较高的样品作为阳性候选参考品。

2.2.2 阴性候选参考品

根据样品初筛,选取15份HBsAg阴性样品作为HBV RNA阴性候选参考品。

2.2.3 精密度和灵敏度候选参考品

HBV RNA精密度和灵敏度候选参考品溯源至HBV RNA检测试剂国家标准品(批号:340008-201901)^[10],该标准品浓度为 $2.1 \times 10^8 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。将标准品复溶并用HBV RNA阴性血浆稀释100倍后的样品作为灵敏度候选参考品,浓度为 $2.1 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。另外,选择浓度为 $1.4 \times 10^7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的HBV RNA标准品备选样品^[11]作为精密度候选参考品。

2.3 协作标定

选择广州海力特生物科技有限公司、圣湘生物科技股份有限公司、上海仁度生物科技有限公司、北京热景生物技术股份有限公司、中山大学达安基因股份有限公司共5家企业(随机编号A~E)进行协作标定,分别使用各自生产的试剂盒对候选参考品进行3次独立试验。其中精密度候选参考品为冻干品,需复溶并稀释10倍后使用,每次试验重复检测10次;灵敏度候选参考品进行10倍系列稀释,直至测定终点。

2.4 参考品及质量标准建立

根据协作标定结果确定阳性参考品、阴性参考品、精密度参考品和灵敏度参考品的组成,将上

述参考品的原料血浆按 $0.5 \text{ mL} \cdot \text{支}^{-1}$ 分装到1.5 mL冻存管中(除冻干品外),置于 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存。然后,制定阳性参考品符合率、阴性参考品符合率、重复性以及最低检测限的质量标准,其中,阳性/阴性参考品符合率为检测结果阳性/阴性与预期结果阳性/阴性的比值,精密度的计算为平行10次检测结果的CV。

2.5 均匀性验证

随机抽取阳性参考品、精密度参考品和灵敏度参考品各3支,采用乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒(RNA捕获探针法)检测HBV RNA浓度,考察参考品的均匀性。

2.6 稳定性验证

将阳性参考品、精密度参考品和灵敏度参考品分别于室温放置3 d以及反复冻融3次后,用乙型肝炎病毒核酸测定试剂盒(RNA捕获探针法)检测,结果与 $-70 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存的参考品比较,考察参考品的加速稳定性和冻融稳定性。

2.7 统计学分析

使用SPSS 19.0软件对均匀性试验结果进行单样本T检验分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果与分析

3.1 阳性候选参考品初筛结果

根据样品初筛,选取12份样品作为HBV RNA阳性候选参考品,检测结果如表1所示。

3.2 协作标定结果

汇总分析协作标定结果,发现所有试剂阳性/阴性参考品符合率均为100%,从精密度结果可以看出,所有试剂重复性较好, $CV \leq 4\%$ ($n=10$)。分析不同试剂的检测限:D试剂和E试剂的最低检测限为 $2.1 \times 10^2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,其余试剂均为 $2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$,表明这些试剂在检测性能上存在一定的差异,可能是由于各试剂间灵敏度的不同造成。结果见表2。

表 1 阳性候选参考品初筛检测结果

样品 编号	HBsAg/ (IU · mL ⁻¹)	HBsAb/ (mIU · mL ⁻¹)	HBsAg (S/CO)	HBsAb (S/CO)	HBsAb (S/CO)	HBcAb (S/CO)	HBV/HCV/ HIV	HBV DNA/ (IU · mL ⁻¹)	HBV RNA 1/ (copies · mL ⁻¹)	HBV RNA 2/ (copies · mL ⁻¹)	HBV RNA 3/ (copies · mL ⁻¹)	HBV RNA 4/ (copies · mL ⁻¹)
R08	43.13	0.15	919.45	41.92	9.82	9.82	HBV	4.53 × 10 ⁵	1.62 × 10 ⁴	6.45 × 10 ³	1.35 × 10 ⁵	1.86 × 10 ⁷
R12	2.67 × 10 ³	0.00	26.84	2.12	9.19	9.19	HBV	5.19 × 10 ⁷	7.20 × 10 ⁶	1.26 × 10 ⁶	9.68 × 10 ⁶	1.63 × 10 ⁷
R13	6.66 × 10 ²	0.00	7.56	1.04	9.51	9.51	HBV	5.70 × 10 ⁷	4.09 × 10 ⁶	2.16 × 10 ⁵	4.28 × 10 ⁶	1.39 × 10 ⁷
R14	2.92 × 10 ³	0.00	0.93	0.44	9.47	9.47	HBV	1.06 × 10 ⁷	1.74 × 10 ⁶	1.03 × 10 ⁵	1.42 × 10 ⁶	1.82 × 10 ⁵
R15	1.42 × 10 ³	0.00	504.77	23.48	10.03	10.03	HBV	2.51 × 10 ⁸	1.48 × 10 ⁷	8.56 × 10 ⁵	4.49 × 10 ⁷	3.16 × 10 ⁷
R17	7.52 × 10 ²	0.00	0.52	0.04	9.23	9.23	HBV	4.45 × 10 ⁶	7.28 × 10 ⁵	1.04 × 10 ⁵	1.61 × 10 ⁶	8.71 × 10 ⁶
R18	73.14	0.02	0.45	0.12	8.84	8.84	HBV	9.71 × 10 ⁵	1.02 × 10 ⁵	5.98 × 10 ⁴	2.27 × 10 ⁵	2.14 × 10 ⁵
R23	6.27 × 10 ²	0.00	0.44	0.01	9.32	9.32	HBV	9.28 × 10 ⁶	6.25 × 10 ⁵	3.37 × 10 ⁴	1.47 × 10 ⁵	9.62 × 10 ⁵
R24	53.82	13.20	18.84	2.77	7.52	7.52	HBV	3.74 × 10 ⁵	8.53 × 10 ⁴	8.41 × 10 ³	2.31 × 10 ⁵	2.69 × 10 ⁶
R25	93.70	0.00	29.43	3.71	9.35	9.35	HBV	1.60 × 10 ⁶	1.18 × 10 ⁵	1.04 × 10 ⁴	9.90 × 10 ⁴	8.51 × 10 ⁴
R26	1.18 × 10 ³	0.00	25.32	3.65	8.98	8.98	HBV	3.52 × 10 ⁶	3.41 × 10 ⁵	5.07 × 10 ⁴	4.83 × 10 ⁵	2.82 × 10 ⁵
R32	6.12 × 10 ³	0.67	773.01	43.40	10.29	10.29	HBV	8.42 × 10 ⁷	2.01 × 10 ⁶	1.15 × 10 ⁵	8.43 × 10 ⁶	6.37 × 10 ⁷

表2 HBV RNA 候选参考品协作标定结果

试剂	阳性符合率 (+/+)	阴性符合率 (-/-)	精密度 (CV)	最低检测限
A	12/12	15/15	1%	$2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$
B	12/12	15/15	2%	$2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$
C	12/12	15/15	4%	$2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$
D	12/12	15/15	1%	$2.1 \times 10^2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$
E	12/12	15/15	1%	$2.1 \times 10^2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$

3.3 参考品及质量标准建立

根据协作标定结果, 确定参考品的组成: 从12份阳性候选参考品中选取10份作为阳性参考品 (P1~P10), 从15份阴性候选参考品中选取10份作为阴性参考品 (N1~N10), 确定精密度和灵敏度候选参考品分别为精密度参考品J和灵敏度参考品L。

制定本参考品的质量标准: ①阳性参考品符合率: 10份阳性参考品符合率 (+/+) 为10/10; ②阴性参考品符合率: 10份阴性参考品符合率

(-/-) 为10/10; ③重复性: 将精密度参考品J稀释10倍后重复检测10次, 要求10次结果的变异系数 $CV \leq 5\%$; ④最低检测限: 不高于 $2.1 \times 10^3 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

3.4 均匀性验证

均匀性试验结果显示, 随机抽取的3支参考品的检测结果对数值的CV均小于5%, 分别对3次检测结果对数值采用T检验分析, $P > 0.05$, 差异无统计学意义, 表明分装的参考品, 支与支之间无显著性差异, 均匀性符合要求。结果见表3。

表3 HBV RNA 检测试剂国家参考品均匀性考察结果 ($\log_{10} \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$)

参考品	第1支	第2支	第3支	CV	P值	t值
P1	7.33	7.30	7.36	0%	1.00	0.00
P2	6.87	6.91	7.26	3%	0.99	0.03
P3	5.21	5.17	5.43	3%	0.99	0.03
P4	6.93	6.63	7.05	3%	1.00	0.00
P5	5.55	5.68	5.68	1%	0.89	0.15
P6	5.64	5.68	5.73	1%	0.91	0.13
P7	5.25	5.23	5.48	3%	1.00	0.00
P8	5.22	5.00	5.48	5%	0.98	0.02
P9	7.92	7.81	8.02	1%	0.96	-0.01
P10	6.34	6.07	6.29	2%	0.97	0.00
J/10	6.23	6.21	6.26	0%	0.84	0.23
L/10	5.09	5.30	5.23	2%	0.96	-0.05

注: 表中 J/10、L/10 分别为精密度参考品 J 和灵敏度参考品 L 稀释 10 倍后的样品, J/10 结果为重复检测 10 次结果平均值的对数值; 下同。

3.5 稳定性验证

3.5.1 加速稳定性评估

经室温放置3 d处理后参考品的检测结果与在

-70 ℃保存的参考品结果进行比较, 各参考品检测结果对数值的绝对偏差均在 ± 0.5 范围内, 表明室温放置3 d后不会影响参考品的稳定性。结果见表4。

表4 HBV RNA 检测试剂国家参考品加速稳定性考察结果 ($\log_{10} \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)

参考品	-70 ℃保存	室温 3 d	绝对偏差
P1	7.4	7.3	-0.1
P2	7.3	7.2	-0.1
P3	5.4	5.5	0.1
P4	7.1	7.3	0.2
P5	5.7	6.0	0.3
P6	5.7	5.9	0.2
P7	5.5	5.7	0.2
P8	5.5	5.4	-0.1
P9	8.0	8.2	0.2
P10	6.3	6.5	0.2
J/10	6.3	6.3	0.0
L/10	5.2	5.4	0.2

3.5.2 冻融稳定性评估

经冻融3次处理后的参考品与-70 ℃保存的参考品进行比较, 各参考品检测结果对数值的绝对偏

差均在 ± 0.5 范围内, 表明反复冻融3次不会影响本参考品的稳定性。结果见表5。

表5 HBV RNA 检测试剂国家参考品冻融稳定性考察结果 ($\log_{10} \text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$)

参考品	-70 ℃保存	冻融 3 次	绝对偏差
P1	7.4	7.4	0.0
P2	7.3	6.9	-0.4
P3	5.4	5.3	-0.1
P4	7.1	6.9	-0.2
P5	5.7	5.6	-0.1
P6	5.7	5.7	0.0
P7	5.5	5.5	0.0
P8	5.5	5.1	-0.4
P9	8.0	7.7	-0.3
P10	6.3	6.2	-0.1
J/10	6.3	6.2	-0.1
L/10	5.2	5.1	-0.1

4 讨论

4.1 参考品原料

由于未收集到经过NAs治疗后CHB患者的血浆样本,本研究选择的阳性参考品均为未经治疗的HBV感染者的血浆样本,HBV RNA和HBV DNA均为阳性,初筛结果显示HBV RNA浓度和HBV DNA浓度成正相关性。这也是本研究的欠缺之处,在未来参考品换代时,阳性参考品应考虑增加HBV RNA阳性且HBV DNA阴性的样本,以便更好地评估试剂的性能。另外,本参考品含有取自人类的材料,并且/或潜藏有传染性成分,未经灭活处理,应按传染性物质处理,操作应按实验室安全管理条例执行。

4.2 检测试剂

目前,HBV RNA定量检测包括基于cDNA末端快速克隆的PCR法^[12]、实时荧光定量PCR法^[13]以及微滴数字PCR法^[14]等多种方法,但是尚无进口检测试剂在国内上市,国产试剂主要为PCR-荧光探针法和RNA捕获探针法两种检测方法,参与本研究协作标定的5家厂商试剂均采用这两种方法。虽然检测方法存在差异,但是这5家试剂的待检样本类型均为血清/血浆,检测样本的浓度单位均为copies·mL⁻¹,检测结果的计算方式以及质量标准均一致。不过由于不同试剂对同一样本检测结果差异较大,因此,在建立HBV RNA国家标准品时依据其HBV DNA浓度进行赋值,将HBV RNA浓度单位统一为U·mL⁻¹,不同试剂对应不同的换算系数^[11]。在考察均匀性和稳定性时,检测结果中U·mL⁻¹为copies·mL⁻¹换算后的结果,该试剂的换算关系:100 U·mL⁻¹≈6 copies·mL⁻¹。

4.3 稳定性评估

稳定性评估是评价参考品质量的关键参数^[15],考虑到参考品在分发、运输以及使用过程中可能存在保存温度变化、反复冻融等风险,本研究选用1家试剂对研制的参考品进行了加速稳定性及冻融稳定性验证。在稳定性验证过程中,对灵敏度参考品进行3个10倍系列稀释后检测结果均为阳性,能够满足最低检测限的要求。虽然本参考品为RNA参考品,但是阳性样本均为高浓度血浆样本,且未经核酸提取,因此会比较稳定。同时,本参考品要求必须严格遵循在-70℃及以下温度保存和运输并避免反复冻融,以保证参考品的稳定。但是本次研究中

缺少对参考品长期稳定性考察,为此后续需持续监测,特别是考察对检测限的影响。

4.4 研制意义

本研究成功研制了HBV RNA检测试剂国家参考品,并制定了统一的质量标准。参考品系用人乙型肝炎病毒RNA阳性血浆及阴性血浆制备而成,共22支样品,0.5 mL·支⁻¹,包括10支阳性参考品、10支阴性参考品、1支精密度参考品和1支灵敏度参考品。本参考品的各项检测指标均符合规定,具有良好的均匀性和稳定性,已获得国家批准文号(340023-202001)^[16],可用于HBV RNA检测试剂的质量控制和评价。本参考品的建立确定了我国HBV RNA检测试剂的最低质量要求,有助于规范和提高国内检测试剂的质量,进一步满足市场的需求。

参考文献:

- [1] 宋金云,王建芳,赵宏宇.慢性乙型肝炎和肝硬化患者血清HBV基因型分析[J].实用肝脏病杂志,2021,24(1):87-90.
- [2] Chen L, Shi Y, Yang WR, et al. Differences in Cpg Island Distribution between Subgenotypes of the Hepatitis B Virus Genotype[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 6781-6784.
- [3] World Health Organization (WHO). Global Hepatitis Report 2017[EB/OL]. (2017-04-19) [2022-06-02]. <https://www.who.int/hepatitis/publications/global-hepatitis-report2017/en/>.
- [4] Ma GH, Lou B, Lv FF, et al. HBcAg and pgRNA and the Therapeutic Effect in HbeAg Positive Patients Receiving Anti-viral Therapy, Baseline Serum HBV-RNA is a Powerful Predictor of Response[J]. J Viral Hepat, 2020, 27(8): 837-846.
- [5] 鲁凤民,王杰,庄辉.HBV RNA病毒样颗粒的潜在临床意义[J].临床肝胆病杂志,2016,32(9):1635-1636.
- [6] Dong J, Ying J, Qiu X, et al. Advanced Strategies for Eliminating the cccDNA of HBV[J]. Dig Dis Sci, 2018, 63(1): 7-15.
- [7] Halgand B, Desterke C, Rivi è re L, et al. Hepatitis B Virus Pregenomic RNA in Hepatocellular Carcinoma: A Nosological and Prognostic Determinant[J]. Hepatology,

- 2018, 67 (1): 86-96.
- [8] Wang J, Yu Y, Li G, et al. Relationship between Serum HBV-RNA Levels and Intrahepatic Viral as well as Histologic Activity Markers in Entecavir-treated Patients[J]. *Hepatology*, 2017, doi:10.1016/j.jhep.2017.08.021.
- [9] 王贵强, 段钟平, 王福生, 等. 慢性乙型肝炎防治指南(2019年版)[J]. *实用肝脏病杂志*, 2020, 23(1): 9-32.
- [10] 中国食品药品检定研究院. 注册检验用体外诊断试剂国家标准品和参考品目录(第九期)[EB/OL]. (2020-09-24) [2022-06-02]. <https://www.nifdc.org.cn/nifdc/bshff/bzhwzh/bzwztzgg/202009240827391048.html>.
- [11] 郝晓甜, 李克坚, 周诚. 乙型肝炎病毒RNA国家标准品的建立[J]. *中国病毒病杂志*, 2022, 12(6): 428-432.
- [12] Gao YH, Li YT, Meng QH, et al. Serum Hepatitis B Virus DNA, RNA, and HBsAg: Which Correlated Better with Intrahepatic Covalently Closed Circular DNA Before and After Nucleos(t)ide Analogue Treatment?[J]. *J Clin Microbiol*, 2017, 55: 2972-2982.
- [13] Butler EK, Gersch J, McNamara A, et al. Hepatitis B Virus Serum DNA and RNA Levels in Nucleos(t)ide Analog-treated or Untreated Patients During Chronic and Acute Infection[J]. *Hepatology*, 2018, 68(6): 2106-2117.
- [14] Bai L, Zhang X, Kozlowski M, et al. Extracellular Hepatitis B virus RNAs are Heterogeneous in Length and Circulate as Capsid-antibody Complexes in Addition to Virions in Chronic Hepatitis B Patients[J]. *J Virol*, 2018, 92(24): e00798-18.
- [15] 陈亚飞, 肖新月, 何平, 等. 标准物质稳定性考察规范解读和有效期管理方式的研究[J]. *中国药事*, 2018, 32(3): 317-322.
- [16] 中国食品药品检定研究院. 注册检验用体外诊断试剂国家标准品和参考品目录(第十期)[EB/OL]. (2021-02-26) [2022-06-02]. <https://www.nifdc.org.cn/nifdc/bshff/bzhwzh/bzwztzgg/202102261755363103.html>.

(收稿日期 2022年6月28日 编辑 王雅雯)