

• 论 著 •

高速离心方案对乙型肝炎病毒回收效果分析*

刘 晓¹, 欧国进², 刘 忠^{2△}

(1. 德阳市人民医院检验科, 四川德阳 618000; 2. 中国医学科学院输血研究所, 四川成都 610052)

摘要:目的 分析不同高速离心方案对乙型肝炎病毒(HBV)回收率的影响。方法 通过双因素交互设计方案将实验按离心力与离心时间分成 44 组, 分析离心力、离心时间及两者之间的交互作用对 HBV 回收率的影响, 并用低载量标本实例验证该效果。结果 当离心力为固定值时, 离心时间 0.5~2.0 h 对 HBV 回收率没有显著影响; 离心力在 $(15\ 000\sim 90\ 800)\times g$ 时, HBV 回收率随着离心力增加而从 $(41.4\pm 7.5)\%$ 增加到 $(83.8\pm 9.5)\%$, 任意 2 组离心力比较差异有统计学意义 ($P<0.05$); 离心力在 $(90\ 800\sim 171\ 900)\times g$ 时, 病毒回收率为 $71.6\%\sim 102.9\%$, 达稳定状态, 任意 2 组比较差异无统计学意义 (均 $P>0.05$); 经高速离心处理后的低载量标本检出率达 100%。结论 高速离心技术可通过加大标本取样量使低载量 HBV 检出率提高, 有效保障血液安全。

关键词: 乙型肝炎病毒; 高速离心; 离心力; 离心时间

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2020.10.012 **中图法分类号:** R575.1

文章编号: 1673-4130(2020)10-1199-04 **文献标识码:** A

Effects of high-speed centrifugation protocol on hepatitis B virus recovery*

LIU Xiao¹, OU Guojin², LIU Zhong^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Deyang People's Hospital, Deyang, Sichuan 618000, China;

2. Institute of Blood Transfusion, Chinese Academy of Medical Sciences,

Chengdu, Sichuan 610052, China)

Abstract: Objective To analyze the effects of different high-speed centrifugation protocols on the recovery of hepatitis B virus (HBV). **Methods** The experiment was divided into 44 groups according to centrifugal force and centrifugation time by a two-factor interaction design scheme. The effects of centrifugal force, centrifugation time, and the interaction between the two on the recovery of HBV were analyzed, and the effect was verified with a low-load specimen example. **Results** When the centrifugal force was a fixed value, the centrifugal time 0.5–2.0 h had no significant effect on the HBV recovery rate; when the centrifugal force was $(15\ 000\sim 90\ 800)\times g$, the HBV recovery rate increases from $(41.4\pm 7.5)\%$ increased to $(83.8\pm 9.5)\%$, the difference between any two groups was statistically significant ($P<0.05$). When the centrifugal force was between $(90\ 800\sim 171\ 900)\times g$, the virus recovery rate was $71.6\%\sim 102.9\%$, reached a stable state, there was no significant difference between any two groups (all $P>0.05$). The detection rate of low-load specimens after high-speed centrifugation reached 100%. **Conclusion** The high-speed centrifugation technology can increase the detection rate of low-load HBV by increasing the sample sampling volume, and effectively guarantee blood safety.

Key words: hepatitis B virus; high-speed centrifugation; centrifugal force; centrifugation time

从核酸检测开始推行后, 乙型肝炎病毒(HBV)的传播风险已经大大降低^[1], 但该检测方法不能 100% 阻断 HBV 经血传播, 原因之一为核酸检测试剂与免疫学检测方法一样有自己的检测下限, 大多数 HBV

核酸检测试剂的灵敏度在 28 copy/mL 以上, 当病毒水平低于该检测下限时, 如隐匿性乙型肝炎感染或病毒感染窗口期, 病毒水平通常 <112 copy/mL, 隐匿性乙型肝炎感染标本的平均载量为 78.4 copy/mL, 但有

* 基金项目: 四川省卫生健康委员会普及项目(18PJ579)。

作者简介: 刘晓, 女, 技师, 主要从事血液病毒传播相关研究。△ 通信作者, E-mail: 1507510568@qq.com。

本文引用格式: 刘晓, 欧国进, 刘忠. 高速离心方案对乙型肝炎病毒回收效果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2020, 41(10): 1199-1202.

时病毒载量低于 28 copy/mL^[1], 这时核酸检测就可能出现漏检。目前报道的输血传播疾病的残余风险主要还是输血感染 HBV^[3-4]。窗口期及隐匿性感染已经成为阻碍血液安全推进的主要瓶颈。另一方面, 由于核酸检测成本昂贵, 为了降低成本, 目前的检测中心大都使用多人份混检^[6-8], HBV 核酸混样检测策略因单个取样量变少而不能确保发现所有的低载量窗口期感染标本。如果在献血者的筛查中未检测出这种极低水平的病毒滴度, 可能会导致严重后果^[9], 已有报道称因输注了未能检测到 HBV-DNA 的血液而感染 HBV^[10]。为了解决该问题, 有研究者提出了病毒浓缩, 即在多人份混检(也可用于单检)情况下, 加大单个标本取样量, 然后运用离心技术将 HBV 病毒沉淀下来, 提高病毒水平, 从而提高检测灵敏度。但目前报道的离心力从(15 000~266 000)×g 不等^[11-12], 离心时间也各不相同, 这就导致了病毒回收差异大, 不能准确提供离心力及离心时间与 HBV 回收率的关系。本文就以上问题, 研究离心力与离心时间对 HBV 回收率的影响, 为大家提供理论基础。

1 资料与方法

1.1 一般资料 HBV 标准品为定量标准品 S1、S2、S3, 定量值分别为 1.65×10^8 、 2.58×10^7 、 1.37×10^6 copy/mL。混样所用阴性标本为德阳市血液中心提供的丙氨酸氨基转移酶异常的报废血, 实验室经核酸检测 HBV、丙型肝炎病毒、人类免疫缺陷病毒均为阴性, 同时其乙型肝炎表面抗原、丙型肝炎抗体、人类免疫缺陷病毒抗体、梅毒抗体也均为阴性。所有标本于 -20 °C 保存。

1.2 仪器与试剂 病毒总核酸提取试剂盒购自德国 Qiagen 公司, 货号 51106; 超高速离心机及超高速离心管购自美国贝克曼公司; 小量核酸提取仪购自美国 Thermo 公司; 荧光定量 PCR 仪购自美国 ABI 公司, 型号 7900HT; HBV 标准品购自中国北京康彻思坦生物技术有限公司。

1.3 方法 取 4 个容量为 1 L 的玻璃瓶, 洗净烘干泡酸后进行高压灭菌处理, 待冷却后每瓶加入 900 mL 的阴性血浆, 然后再加入 650 μ L 的 S3 HBV 标准品(水平为 1.37×10^6 copy/mL), 上下颠倒充分混匀(不少于 20 次)制成原倍血浆。此时, 每瓶 HBV 理论水平为 985.6 copy/mL。将混匀的 HBV 标本用无菌一次性注射器分装至 264 个离心管中, 每管分装 13 mL(理论容量为 13.5 mL), 经称量平衡后将管口密封。另取 6 个离心管只分装阴性血浆, 作为阴性对照, 共 270 管。

1.3.1 离心力与离心时间的双因素交互分析设计 将 264 个阳性离心管按离心力(15 000~171 000)×g 与离心时间 0.5~2.0 h 分成 44 组, 每组做 6 个平行

管。每组按相应条件进行 4 °C 低温高速离心, 离心后弃上清留病毒沉淀, 沉淀用 200 μ L 的磷酸盐缓冲液吹打混匀, 并转移到 1.5 mL 的离心管中, 准备后续提取及扩增检测(若不能及时进行提取, 可于 -20 °C 保存)。6 个阴性对照随机与实验组一同处理。另取 6 个离心管, 每管取 200 μ L 的原倍血浆作为原始水平对照, 与离心处理后的标本同时进行提取、扩增、检测。计算离心浓缩后的病毒水平及回收率。

1.3.2 HBV-DNA 提取 对含 200 μ L 原倍血浆或经离心处理后的 200 μ L 的浓缩液进行提取, 提取使用凯杰过柱法, 同时提取 5 个标准品, 提取用量为 200 μ L。

1.3.3 HBV-DNA 扩增及检测 使用实验室 HBV 荧光定量检测方法, HBV 上游引物: 5'-ATG TGT CTG CGG CGT TTT ATC-3', 下游引物: 5'-ACA MAC GGG CAA CAT ACC TT-3'。探针: FAM-CAT CCT GCT GCT ATG CCT CAT CTT CT-HBQ。25 μ L 反应体系: 2×Taq PCR Master Mix 12.5 μ L, 正反向引物各 0.5 μ L, 探针 0.4 μ L, DNA 模板 4 μ L, 双蒸水 7.1 μ L, 采用荧光定量 PCR 仪进行检测。程序设置: 95 °C 5 min; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 45 个循环, 荧光收集在 60 °C。

1.3.4 引入高速离心浓缩技术后的灵敏度验证 取 S3 标准品分别制备成 11.2 copy/mL 及 5.6 copy/mL 的 HBV 标准品。取 8 个超高速离心管, 每管加入 2 mL 的 11.2 copy/mL 的血浆, 然后用阴性血浆加满离心管, 另取 8 个离心管, 每管加入 4 mL 的 5.6 copy/mL 的血浆, 然后用阴性血浆加满离心管。再取 2 个离心管分装阴性血浆, 作为阴性对照。称量配平后封管, 107 000×g 离心 1 h 后弃上清, 重悬沉淀, 200 μ L 溶液提取 DNA, 步骤同 1.3.2。HBV 扩增及检测同步骤 1.3.3。另各取 2 份 200 μ L 的未离心原标本与离心后标本一同提取 DNA 及后续扩增检测。

1.4 统计学处理 该结果所有数据均由 SPSS12.0 软件进行处理, 各组间数据的比较依据资料的性质, 采用 *t* 检验和双因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同高速离心方案的检测结果及回收率 阴性对照管检测结果均为阴性。HBV 原倍血浆检测结果的均值为 941.36 copy/mL(理论水平为 985.6 copy/mL), 回收率为 95.5%。见表 1、图 1。

2.2 离心时间对 HBV 回收率的影响 经 SPSS12.0 软件分析, $P = 0.352$, 不拒绝原假设, 认为时间对回收率没有明显影响。即在任意固定的离心力下, 离心时间的差异对病毒回收影响不大。

表 1 不同离心力与离心时间的检测结果 (copy/mL)

时间(h)	15 000×g	26 700×g	37 300×g	58 700×g	74 900×g	90 800×g	107 100×g	122 900×g	138 900×g	154 900×g	171 000×g
0.5	24 201±5 137	31 407±4 614	35 812±6 310	41 543±4 389	45 080±4 863	51 772±5 733	54 413±6 958	53 303±4 926	55 085±8 494	54 441±7 584	52 183±7 957
1.0	26 348±4 112	33 012±4 084	37 007±6 272	42 513±8 285	42 149±5 419	56 056±7 557	61 591±1 454	56 243±6 535	56 000±6 382	52 743±5 743	53 928±7 154
1.5	26 927±4 047	32 909±4 375	38 621±5 171	42 009±4 851	46 620±6 819	54 619±5 246	54 189±8 115	55 253±9 588	57 092±7 755	53 807±5 982	51 847±7 773
2.0	28 429±5 793	33 227±4 567	37 455±5 308	43 101±4 709	47 077±8 419	54 339±4 984	55 095±6 633	55 664±5 639	55 160±5 625	53 816±5 476	52 360±5 720

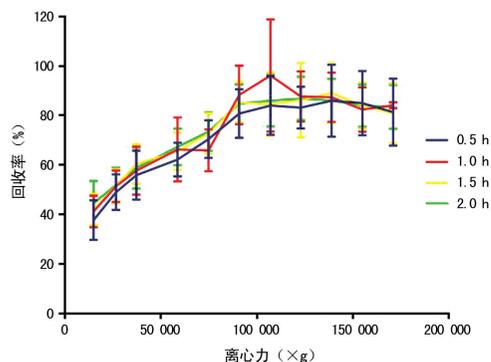
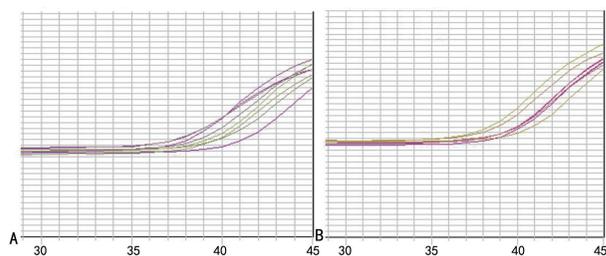


图 1 不同离心时间、离心力下的 HBV 回收率

2.3 离心力对 HBV 回收率的影响 经 SPSS12.0 统计软件分析, $P=0.000$, 拒绝原假设, 认为离心力对回收率有明显影响。(15 000~90 800)×g 之间任意 2 组比较差异均有统计学意义 ($P<0.05$), 即在这个范围内, HBV 回收率随着离心力的增加而增加, 回收率在 $(41.4 \pm 7.5)\% \sim (83.8 \pm 9.5)\%$ 。离心力在 (90 800~171 000)×g, 任意 2 组比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$), 即在这个范围内, 回收率相对稳定, 达 $71.6\% \sim 102.9\%$ 。

表 2 低载量标本高速离心处理后定量结果

原始水平 (copy/mL)	取样量 (mL)	重复次数 (次)	浓缩后阳性率 (%)	平均定量值 (copy/mL)
11.2	2	8	100	68.60
5.6	4	8	100	81.65



注: A 表示 HBV 水平为 5.6 copy/mL 的扩增曲线; B 表示 HBV 水平为 11.2 copy/mL 的扩增曲线。

图 2 高速离心后的效果验证

2.4 离心力、离心时间的交互作用对 HBV 回收率的影响 经 SPSS12.0 统计软件分析(双因素交互方差分析), 该结果 $P=1.000$, 不拒绝原假设, 无证据表明交互作用对回收率有显著影响, 即说明这 2 个因素是相互独立的, 没有交互作用。

2.5 高速离心处理低载量标本后的效果验证 离心条件: $107\ 000 \times g, 4\ ^\circ C$ 离心 1 h。阴性对照均无扩增曲线, 未离心原标本均未检出, 见表 2、图 2。

3 讨论

中国是乙型肝炎大国, 严重威胁到血液安全。在 HBV 感染的“窗口期”、免疫静默感染、隐匿性感染及自限性感染末期的携带者可能出现极低水平的 HBV-DNA, 低水平 HBV-DNA 的患者体内可能存在着肝脏的持续性损伤和病毒复制, 一旦发生漏检就会严重影响临床诊治和输血安全, 应引起高度重视。这时想要准确检测到病毒载量, 不仅与灵敏度高的检测试剂有关, 还与取样概率有关, 因为 HBV 病毒在人体中呈现泊松分布^[2,13], 如果取样量过低, 就会出现假阴性情况, 尤其是在多人份混检时(相当于将标本稀释), 这种情况更加明显。

本文基于已报道过的离心力及离心时间, 通过一系列的离心力及离心时间来研究 HBV 回收率及其关系。根据实验结果显示, 离心力是影响回收率的最大因素, 当离心力在 (15 000~90 800)×g 时, 随着离心力的增加, 回收率也从 41.4% 上升到 83.8%, 且各组间比较差异有统计学意义 ($P<0.05$)。而后随着离心力在一定范围内 [(90 800~171 000)×g] 增加, 病毒回收率相对稳定, 维持在 $82.5\% \sim 87.9\%$, 各组之间比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。当离心力过大时 ($171\ 000 \times g$), 回收率有下降趋势, 可能原因是离心力过大, 沉淀物与管壁黏附较牢固, 洗脱不充分, 导致回收率下降。又或是离心力大而沉淀了过多的杂质, 抑制了检测步骤中荧光定量 PCR 的反应, 不排除操作误差导致了数据的偏差。离心时间、离心力与时间交互作用对回收率影响不大, 实际工作中考虑到时间效益, 可以选择 0.5 h 的离心时间。

按本次实验中的 80% 回收率计算, 当进行 $n (n \geq 2)$ 倍离心浓缩时, 则病毒水平提高 0.8n 倍, 即可以提高检测试剂盒的灵敏度 0.8n 倍。例如试剂盒的灵敏度为 224 copy/mL, 而标本 HBV 水平为 28 copy/mL, 进行 10 倍浓缩时(若不进行离心浓缩, 将可能出现漏检), 标本水平可提高至 224 copy/mL, 从而达到检测试剂盒的灵敏度(相当于试剂盒检出下限可达 28 copy/mL), 可以减少因试剂盒灵敏度不够而导致的漏检。为了验证该结论, 笔者将 HBV 标准品

分别稀释至 11.2 copy/mL、5.6 copy/mL,按 80% 的回收率计算,则 11.2 copy/mL 的标本需进行 10 倍浓缩,即将取样量增加至 2 mL,才能达到本实验室 HBV 检测试剂的灵敏度(90.72 copy/mL),对应的 5.6 copy/mL 的标本需 20 倍浓缩,即 4 mL 取样量,然后经超高速离心(90 800~171 000)×g 1 h 后检测标本。结果显示检出率均为 100%。

目前国内有一些关于 HBV 浓缩的文章,1 篇在 20 000×g 离心 30 min 时的浓缩效率高达 90% 以上^[12],与本文差距较大,原因为该文中使用了聚乙二醇浓缩剂,其可以减少病毒分子间距,使其快速沉淀下来,大大增加了浓缩效率,但该法加入外来试剂,易引起污染,且聚乙二醇试剂加入量为总容量的 50%,这样不能处理多混样的大容量标本。而其他研究中,24 600×g 离心 1 h 时 HBV 的回收率在 40%~90%^[13-14],回收差异大,而且使用的离心机为高速台式冷冻离心机,一次只能处理小容量的标本,并不适用于大容量标本浓缩。本法不需要加入外来试剂,有效避免污染,且适用于大容量标本或者多标本的处理。

4 结 论

高速离心技术可使 HBV 检出率提高,通过适当增加标本量,可检出低至 5.6~11.2 copy/mL 甚至更低的 HBV 病毒载量。

参考文献

[1] 杜红梅,陈丹. ELISA 与核酸联合应用于平顶山地区血液筛查的结果分析[J]. 中国输血杂志,2018,31(11):1308-1310.

[2] 丁国良,刘红玉,韩春花,等. 低病毒载量病毒在血浆标本中的分布规律及其检出概率的研究[J]. 国际输血及血液学杂志,2018,41(2):145-149.

[3] 杨琳琳,王艺芳,葛文超,等. 2012—2017 年郑州地区无偿

献血者核酸检测结果分析[J]. 实验与检验医学,2019,37(3):546-548.

[4] 李敏,韩晓燕,朱建民,等. 渭南地区无偿献血人群核酸检测结果分析[J]. 临床输血与检验,2018,20(6):572-575.

[5] 周磊,刘颖,邓雪莲,等. 核酸筛查中混检阳性拆分单检阴性血液标本的 HBV 残余风险分析[J]. 中国输血杂志,2018,31(9):985-988.

[6] 许友山,钱惠忠,胡越,等. 血液核酸筛查技术的应用分析[J]. 中国艾滋病性病,2018,24(9):926-928.

[7] 李莉华,马印图. 核酸检测技术应用于血液筛查的检测效能分析[J]. 第三军医大学学报,2015,37(16):1692-1694.

[8] 覃柳燕,孙雪芬,陶丽芳,等. 血液病毒核酸集中化检测在柳州地区开展情况的研究[J]. 检验医学与临床,2019,16(12):1756-1758

[9] 朱为刚,王立林,聂冬梅,等. 核酸检测试剂 cobas MPX v2.0 降低输血 HBV 残余风险的评估[J]. 中国输血杂志,2016,29(6):574-577.

[10] ARORA S,DODA V,KIRTANIA T, et al. Sensitivity of individual donor nucleic acid testing (NAT) for the detection of hepatitis B infection by studying diluted NAT yield samples[J]. Blood Transfus,2015,13(2):227-232.

[11] CHAMNI N,LOUISIRIROTCHANAKUL S, OOTA S, et al. Genetic characterization and genotyping of hepatitis B virus (HBV) isolates from donors with an occult HBV infection[J]. Vox Sang,2014,107(4):324-332.

[12] 周静宇,蔡杰,许纪玲,等. HBV 血液大标本浓缩核酸检测方案研究[J]. 中国输血杂志,2014,27(7):725-727.

[13] 邓雪莲,李婷婷,郭笑寒,等. 核酸检测非重复反应性的 HBsAg 阴性血液 HBV 感染的确认[J]. 中国输血杂志,2018,31(9):962-967.

[14] 王卓妍,龚晓燕,宋美兰,等. 超速离心浓缩技术富集 HBV 和 HCV 颗粒的效果研究[J]. 中国输血杂志,2012,25(12):1295-1296.

(收稿日期:2019-12-15 修回日期:2020-03-08)

(上接第 1198 页)

[17] OKAZAKI H,SHIRAKABE A,KOBAYASHI N, et al. Are atherosclerotic risk factors associated with a poor prognosis in patients with hyperuricemic acute heart failure? The evaluation of the causal dependence of acute heart failure and hyperuricemia[J]. Heart Vessels,2017,32(4):1-10.

[18] LEE H W,CHOI S M,LEE J, et al. Serum uric acid level as a prognostic marker in patients with acute respiratory distress syndrome[J]. J Intensive Care Med,2019,34(5):404-410.

[19] SAADAT P,AHANGAR A A,BABAEI M, et al. Relationship of serum uric acid level with demographic features,risk factors,severity,prognosis,serum levels of vitamin D,calcium,and magnesium in stroke[J]. Stroke Res Treat,2018,2(1):1-8.

[20] YU Z,ZHANG S,WANG D, et al. The significance of uric acid in the diagnosis and treatment of Parkinson disease:an updated systemic review[J]. Medicine,2017,96(45):e8502.

(收稿日期:2019-12-19 修回日期:2020-03-06)