

乙型肝炎病毒 DNA 在低温储存血浆中稳定性的研究

谢 丽, 邓 燕, 易 珍, 陈学杰, 黄 莉, 李 山[△], 秦 雪 (广西医科大学第一附属医院检验科, 南宁 530021)

【摘要】 目的 了解-20℃条件下储存 30 d 后血浆中乙型肝炎病毒(HBV)脱氧核糖核酸(DNA)的稳定性。**方法** 收集载量 $10^3 \sim 10^7$ copy/mL 的 30 份乙型肝炎患者血浆, 并分为低载量组、中载量组、高载量组。标本采集后立即分离血浆并进行基线(0 d)载量检测, 其余血浆于-20℃存储, 分别在第 1、3、7、14、21 和 30 天进行实时荧光定量测定。**结果** (1)将 30 份样本进行不同时间点的配对 *t* 检验, 载量差异均无统计学意义: 第 1 天与第 0 天比较($t = -0.327, P = 0.746$); 第 3 天与第 0 天比较($t = -0.718, P = 0.479$); 第 7 天与第 0 天比较($t = -0.682, P = 0.500$); 第 14 天与第 0 天比较($t = -1.072, P = 0.292$); 第 21 天与第 0 天比较($t = -0.818, P = 0.420$); 第 30 天与第 0 天比较($t = 0.635, P = 0.530$)。 (2)分组比较中, 第 30 天与第 0 天比较, HBV DNA 载量差异无统计学意义: 低载量组 $P = 0.984$; 中载量组 $P = 0.708$; 高载量组 $P = 0.120$ 。**结论** -20℃储存 30 d, 血浆标本 HBV DNA 载量未出现连续下降或上升趋势, 且不同时间点与第 0 天的基线载量比较差异无统计学意义。

【关键词】 储存时间; 乙型肝炎病毒; DNA; 稳定性

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2015.08.023 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2015)08-1086-03

Stability of hepatitis B virus DNA in plasma in low temperature storage XIE Li, DENG Yan, YI Zhen, CHEN Xue-jie, HUANG Li, LI Shan[△], QIN Xue (Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning, Guangxi Zhuang Autonomous Region 530021, China)

【Abstract】 Objective To analyze stability of HBV DNA in 30 EDTA anticoagulants plasma in the order of magnitude between 1 000 and 10 000 000 copy/mL over a 30 day period. **Methods** Thirty plasma samples were grouped into three categories according to the viral loads, including low viral loads, intermediate viral loads and high viral loads. Ten milliliters of whole blood was freshly collected from each patient. Plasma samples without hemolysis were divided into 1 mL aliquots. One aliquot was processed immediately (Day 0) for baseline RT-PCR assays. The remaining aliquots were then processed after 1, 3, 7, 14, 21 or 30 day of storage at -20℃. **Results** There was no significant difference between the mean of the difference time point in viral loads following storage at -20℃ by paired-samples *t* test, including Day 1 compared to Day 0 ($t = -0.327, P = 0.746$), Day 3 compared to Day 0 ($t = -0.718, P = 0.479$), Day 7 compared to Day 0 ($t = -0.682, P = 0.500$), Day 14 compared to Day 0 ($t = -1.072, P = 0.292$), and Day 21 compared to Day 0 ($t = -0.818, P = 0.420$). Day 30 compared to Day 0 ($t = 0.635, P = 0.530$). **Conclusion** The concentration of HBV DNA in all samples stored at -20℃ for 30 days did not differ significantly from the baseline viral load, and it was not observed the trend in continued degradation in different time point (Day 1, 3, 7, 14 and 21).

【Key words】 prolong period; cytomegalovirus; DNA; stability

乙型肝炎病毒(HBV)感染是一个全球性的健康问题, 是引起慢性肝炎、肝硬化、肝癌的主要原因之一。我国是 HBV 感染的高发地区, 慢性乙型肝炎患者的高病毒载量与肝细胞性肝癌的发展密切相关^[1]。目前, HBV 感染的实验室诊断主要依赖血清特异性抗原抗体和 DNA 的检测, 包括时间分辨荧光分析法、酶免疫测定技术、放射免疫分析法和实时荧光定量检测(RT-PCR)。前三种方法用于检测 HBV 血清标志物, 是根据人体对 HBV 的免疫反应产生的表达产物及其抗体应答系统进行检测, 间接反映复制情况。而 RT-PCR 是检测 HBV 的核酸, 能更精确反映人体内 HBV 的数量状态, 直接反映 HBV 复制传染性的指标。RT-PCR 方法可用于诊断感染的慢性携带者、抗病毒治疗后的疗效评估、治疗药物的选择及协助诊断因遗传变异导致的血清学无法检测者^[2-3]。本研究将 30 份血浆标本在-20℃条件下储存 30 d, 在第 1、3、7、14、21 和 30 天

的 6 个时间点进行动态检测, 分析稳定性, 希望为相关实验室提供依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 样本取自 2013 年 1~8 月广西医科大学第一附属医院感染性疾病科收治的乙型肝炎患者血浆 30 份, 其中男 22 份, 女 8 份; 年龄 16~45 岁, 平均 28 岁。其中, 乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎病毒 e 抗体(抗-HBe)、乙型肝炎病毒核心抗体(抗-HBc)3 项阳性即“小三阳”者 18 例, HBsAg、乙型肝炎病毒 e 抗原(HBeAg)、抗-HBe 3 项阳性即“大三阳”者 12 例。

1.2 血浆样本 根据载量将 30 份无溶血的血浆样本分成 3 组: (1)10 份样本为低载量($10^3 \sim 10^4$ copy/mL), 平均 4 906 copy/mL, 范围在 1 754~8 153 copy/mL; (2)10 份样本为中载量($10^4 \sim 10^5$ copy/mL), 平均 52 647 copy/mL, 范围 14 780~

作者简介: 谢丽, 女, 主管技师, 在读博士, 主要从事基因组学方面的研究。

[△] 通讯作者, E-mail: lis8858@163.com。

88 912 copy/mL;(3)10 份样本为高载量($10^5\sim10^7$ copy/mL),平均 1 002 528 copy/mL,范围 85 670~2 511 660 copy/mL。

1.3 RT-PCR 检测

1.3.1 样本处理 每例患者收集 10 mL 的全血至含乙二胺四乙酸(EDTA)的抗凝管(上海科华诊断医疗产品有限公司),然后立即运送至实验室进行离心分离(700 r/min 离心 10 min)。取离心后无溶血的血浆标本 1 mL 立即进行基线 RT-PCR 分析(0 d),其余血浆分成 6 管,每管 1.5 mL 在-20 ℃存储,分别在第 1、3、7、14、21 和 30 天取其中一份标本进行 RT-PCR。每次检测前均进行再次离心(700 r/min 离心 10 min)。

1.3.2 RT-PCR 核酸提取和 RT-PCR 均使用乙型肝炎病毒(HBV)核酸定量测定试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司)。在 PCR 反应管中加入 5 μ L 核酸释放剂(试剂盒提供),再加入 5 μ L 待测血浆样本,混匀后室温静置 10 min,加入 40 μ L PCR 反应试剂,混匀后上机进行 PCR 扩增。扩增和循环条件为:

55 ℃ 反应 2 min,94 ℃ 反应 5 min,再按 94 ℃ 15 s,57 ℃ 30 s 进行 45 个循环。每次运行包含阴性对照、阳性对照和空白对照,判断是否存在 PCR 抑制和防止假阳性结果。反应结束后,仪器根据标准曲线自动给出结果。实验室室温保持在 22~24 ℃,相对湿度(65 $\pm$ 5)%。所有标本都是由相同的技术人员在同等条件下完成。

1.4 统计学处理 数据首先进行 log¹⁰ 转换,应用配对 *t* 检验进行统计学分析,*P*<0.05 表示差异有统计学意义,所有数据均经 SPSS 17.0 统计软件包处理。

2 结 果

2.1 不同时间点 RT-PCR 检测的载量 在 30 份血浆标本检测过程中,所有对照都成功地被检测,表明 RT-PCR 过程中无抑制和假阳性现象。各组标本在第 0、1、3、7、14、21 和 30 天 RT-PCR 检测的平均载量值如表 1 所示。

表 1 不同时间点 RT-PCR 检测的 HBV 载量(log¹⁰ copy/mL)

HBV 分组	<i>n</i>	第 0 天	第 1 天	第 3 天	第 7 天	第 14 天	第 21 天	第 30 天
低载量组	10	3.638 $\pm$ 0.244	3.639 $\pm$ 0.235	3.622 $\pm$ 0.263	3.641 $\pm$ 0.290	3.540 $\pm$ 0.295	3.634 $\pm$ 0.242	3.638 $\pm$ 0.251
中载量组	10	4.658 $\pm$ 0.263	4.631 $\pm$ 0.266	4.660 $\pm$ 0.255	4.625 $\pm$ 0.265	4.645 $\pm$ 0.248	4.631 $\pm$ 0.273	4.649 $\pm$ 0.237
高载量组	10	5.747 $\pm$ 0.546	5.758 $\pm$ 0.505	5.745 $\pm$ 0.533	5.744 $\pm$ 0.489	5.749 $\pm$ 0.503	5.758 $\pm$ 0.509	5.580 $\pm$ 0.516

HBV 低载量组 10 份标本中,每毫升标本拷贝数的常用对数值 3.192~3.911,在 7 个不同时间点检测的平均病毒载量相近,第 0 天与第 30 天平均病毒载量的常用对数值为 3.638 和 3.639,且差异无统计学意义(*t*=0.021,*P*=0.948)。中载量组 10 份标本中,每毫升标本拷贝数的常用对数值 4.170~4.949,在不同时间点检测的平均病毒载量相近,第 0 天与第 30 天平均病毒载量的常用对数值由 4.658 下降至 4.648,且差异无统计学意义(*t*=-0.387,*P*=0.708)。高载量组 10 份标本中,每毫升标本拷贝数的常用对数值 4.933~6.400,第 0 天与第 30 天平均病毒载量的常用对数值由 5.747 升高至 5.780,且差异无统计学意义(*t*=1.717,*P*=0.120)。将 30 份样本进行不同时间点的配对 *t* 检验,载量差异无统计学意义,第 1 天与第 0 天比较(*t*=-0.327,*P*=0.746);第 3 天与第 0 天比较(*t*=-0.718,*P*=0.479);第 7 天与第 0 天比较(*t*=-0.682,*P*=0.500);第 14 天与第 0 天比较(*t*=-1.072,*P*=0.292);第 21 天与第 0 天比较(*t*=-0.818,*P*=0.420);第 30 天与第 0 天比较(*t*=0.635,*P*=0.530)。

(*t*=5.085,*P*=0.000);14 份标本为第 30 天 HBV 载量值比第 0 天稍高(-0.052 $\pm$ 0.049),差异有统计学意义(*t*=-4.031,*P*=0.001)。全部样本第 30 天与第 0 天比较,HBV 载量差异无统计学意义(*t*=0.635,*P*=0.530)。

3 讨 论

到目前为止,RT-PCR 是一种快速、敏感、实用的检测方法。但是,在我国仍有许多医院并未具备开展检测病毒载量的临床基因扩增实验室。因此,部分乙型肝炎患者标本只能定时定点地送往远离的病毒学实验室。可见,当务之急是如何保证血液标本收集、处理和存储方法正确、恰当并优化,以确保后续 HBV 载量检测结果的准确性和重复性。

PCR 技术中核酸提取是一个重要环节,本试验中采用一步法提取,无需对样本进行加热、高速离心富集病毒等过程,能够避免病毒核酸的损失,也避免了可能的核酸酶污染,从而使定量更准确。Schafer 等^[4]认为,延迟血浆样本的处理可能导致巨细胞病毒 PCR 结果的假阳性率增高。自从 HBV 检测试剂盒商品化后,分析前质量控制的重要性就不言而喻,如样本收集、运输、处理等,延迟处理就可能致细胞破坏、标本溶血,影响 PCR 检测的准确性^[4]。为排除血浆中不可预测的影响因素,本研究在每次测试前都对样本进行重复离心,从而有助于确保 PCR 检测的准确性,对于第 30 天载量测定与第 0 天之间差异无统计学意义起一定的积极作用。

对于血清样本的稳定性,不仅储存温度、储存时间对其有影响,反复冻融也可能是影响因素之一。Sanlidag 等^[5]对 5 份血清样本在首次采集后于-20 ℃冻存 2 d,在随后的 10 次反复溶解、冻存中检测稳定性,结果未见改变。表明对于临床标本无需采集后进行小份分装,不但减少工作强度,且在反复冻存、溶解 10 次内进行检测,其结果仍然有效。但是,该试验标本较少,其可靠性仍需进一步证实。而本试验中,每份标本的检测均为一次性冻存和溶解过程,排除了多次反复冻存溶解对结果的可能影响。结果显示,不管是分为 HBV 低病毒载量

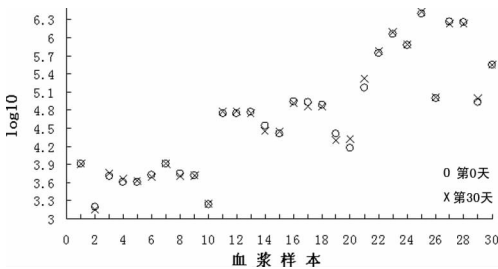


图 1 第 30 天和第 0 天血浆样本稳定性比较

2.2 RT-PCR 检测的第 30 天与第 0 天 HBV 载量值比较 所有 30 份标本 RT-PCR 检测的第 30 天与第 0 天 HBV 载量值见图 1。其中,有 4 份标本第 30 天 HBV 载量值与第 0 天相近或重叠(7 号、9 号、24 号和 30 号标本);12 份标本为第 30 天 HBV 载量值较第 0 天低(0.044 $\pm$ 0.030),差异有统计学意义

组、中病毒载量组和高病毒载量组,或不分组分析,30 份样本的 HBV 平均载量值在第 0 天与其他 6 个时间点(第 1、3、7、14、21、30 天)比较,差异无统计学意义,试验中血浆样本储存于-20℃,结果与已发表的研究相似。Jose 等^[6]报道,血浆样本在 5、25℃ 储存 28 d,其稳定性不变。Gessoni 等^[7]研究报道,血浆样本丙型肝炎病毒(HCV)、人类免疫缺陷病毒(HIV-1)和 HBV 的稳定性,在 4℃ 条件下,HCV 和 HIV-1 的核糖核酸能够储存 72 h,HBV DNA 能够储存 7 d。

对于定量 PCR 检测的室间质量评价的可接受范围,我国卫生部临床检验中心采用溯源至国家标准品得出的检测值换算成的对数值±0.4 为可接受范围^[8]。试验的 30 份标本,可能由于个体差异和技术固有误差而导致第 30 天结果低于或高于第 0 天,分别比较后差异有统计学意义,但各对数值均在可接受范围内。当不分组比较后,全部样本第 30 天与第 0 天比较 HBV 载量差异无统计学意义($t=0.635, P=0.530$),说明升高或降低对临床判断影响极小。同样,Baleriola 等^[9]报道,临床样品在-20、-70℃ 存储长达 9 年后,检测 HCV、HIV、HBV 载量,认为其改变对于临床判断无影响。并且,Fung 等^[10]报道,冷冻保存 105 份临床样品 12 个月后,其 HBsAg 表达也无改变,仍可用于临床监测。

综上所述,本研究结果表明,血浆标本-20℃ 储存 30 d 中,在第 1、3、7、14、21 和 30 天的 6 个时间点进行动态检测,HBV 载量未出现连续下降或上升的改变,且不同时间点与第 0 天的基线载量比较差异均无统计学意义。希望能为相关临床实验室提供有用的试验依据:如果未能每天进行 PCR 检测,可在一定时间内(30 d)每周进行几次 HBV 载量的批处理测试;对于一些临床需要复检的结果,在排除不可预测的血浆因素后(如重复离心),30 d 内进行重复检测,其结果可信;实验室都应根据各自的技术条件对临床标本的储存条件进行优化,以保障 PCR 检测的规范性和结果的准确性。

参考文献

[1] Zhou JY,Zhang L,Li L,et al. High hepatitis B virus load is associated with hepatocellular carcinomas development

(上接第 1085 页)

[2] 毛克亚,王岩,肖嵩华,等.微创手术治疗单节段腰椎管狭窄症的疗效评价[J].中国脊柱脊髓杂志,2011,21(2):113-117.

[3] 李永津,许鸿智,陈博来,等.老年退行性腰椎管狭窄症非手术治疗与手术治疗疗效比较[J].南方医科大学学报,2011,31(1):190-193.

[4] 刘新宇,原所茂,田永昊,等.腰椎棘突劈开椎管减压术治疗退变性腰椎管狭窄症[J].中国脊柱脊髓杂志,2011,21(8):650-653.

[5] 金柏军,钱宇,徐国健,等.下腰痛患者与腰椎前凸度及骶骨倾斜度的关系[J].中国脊柱脊髓杂志,2004,14(6):364-365.

[6] 王文军,薛静波,晏怡果,等.单侧微创经椎间孔腰椎椎体间融合内固定治疗腰椎退变性疾病[J].脊柱外科杂志,2012,10(1):9-12.

[7] 周志刚,李志忠,焦根龙,等.后路手术治疗退变性腰椎侧

in Chinese chronic hepatitis B patients: a case control study[J]. Virology Journal,2012,92(9):16-20.

[2] Park NH,Chung YH. Molecular mechanisms of hepatitis B virus-associated hepatocellular carcinoma[J]. Korean J Hepatol,2007,13(3):320-340.

[3] 李金明. 聚合酶链反应临床应用的优越性和局限性[J]. 中华检验医学杂志,2005,28(3):225-226.

[4] Schafer P,Tenschert W,Schroter M,et al. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation[J]. J Clin Microbiol,2000,38(9):3249-3253.

[5] Sanlidag T,Akali S,Ozbakkaloglu B. Serum hepatitis B DNA:stability in relation to multiple freeze-thaw procedures[J]. J Virol Methods,2005,123(1):49-52.

[6] Jose M,Gajardo R,Jorquera J. Stability of HCV, HIV-1 and HBV nucleic acids in plasma samples under long-term storage[J]. Biologicals,2005,33(1):9-16.

[7] Gessoni G,Barin P,Valverde S,et al. Biological qualification of blood units: considerations about the effects of sample's handling and storage on stability of nucleic acids [J]. Transfus Apheresis Sci,2004,30(3):197-203.

[8] 肖艳群,蒋玲丽,金中淦,等. 定量 PCR HBV DNA 室间质量评价可接受范围的探讨[J]. 检验医学,2012,27(6):503-505.

[9] Baleriola C,Johal H,Jacka B,et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at -20℃ and -70℃ [J]. J Clin Microbiol,2011,49(9):3163-3167.

[10] Fung J,Lai CL,Young J,et al. Stability of hepatitis B surface antigen over time: implications for studies using stored sera [J]. J Med Virol,2011,83(11):1900-1904.

(收稿日期:2014-12-05 修回日期:2014-12-20)

弯疗效观察[J]. 山东医药,2011,51(10):45-46.

[8] 胡元斌,王浩. 后路椎间盘镜手术治疗退变性腰椎管狭窄症[J]. 实用骨科杂志,2013,19(7):584-586.

[9] 孙浩林,李淳德,刘宪义,等. 棘突间动态稳定系统治疗腰椎退变性疾病的并发症分析[J]. 中华外科杂志,2013,51(1):35-39.

[10] 顾广飞,张海龙,贺石生,等. 微创经椎间孔腰椎体间融合术治疗腰椎管狭窄合并腰椎不稳症[J]. 中华外科杂志,2011,49(12):1081-1085.

[11] 黄隆,何立江. 后路减压内固定术治疗腰椎管狭窄 100 例[J]. 中国老年学杂志,2012,32(5):1059-1060.

[12] 吴叶,商卫林,卜国云,等. 单纯后路腰椎减压术对老年腰椎管狭窄患者临床疗效观察[J]. 中国疼痛医学杂志,2011,17(3):141-145.

(收稿日期:2014-10-25 修回日期:2014-11-22)