

不同消毒剂对 HBV 核酸和表面抗原的作用效果研究

邱 丰 周为民 尹文娇 周文亭 曹经瑗 毕胜利 武桂珍

摘要 **目的** 评价实验室常用的消毒剂对乙型肝炎病毒(HBV)的核酸和表面抗原的作用效果。**方法** 采用悬液法将不同消毒剂与 HBV 混合,通过酶联免疫吸附试验(ELISA)评价消毒剂对乙肝表面抗原(HBsAg)的作用效果,通过实时荧光定量 PCR 评价消毒剂对 HBV DNA 的作用效果。**结果** 对于高浓度的 HBV 核酸和 HBsAg,1% 卫可(Virkon)处理 1h 可使 HBV DNA 和 HBsAg 变为阴性,含氯消毒剂和 75% 乙醇仅对低浓度 HBV 血清有效,而过氧化氢对所有浓度的 HBV 核酸和 HBsAg 效果都不明显。**结论** 当实验室发生 HBV 阳性血清溅洒等生物安全事故时,采用 20~40 倍体积 1% 卫可处理 1h 较为适宜。

关键词 乙型肝炎病毒 消毒剂 酶联免疫吸附试验 实时荧光定量 PCR

中图分类号 R512.6

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.015

Effect of Various Disinfectants against HBV DNA and HBV Surface Antigen. Qiu Feng, Zhou Weimin, Yin Wenjiao, et al. Institute of Viral Disease Control and Prevention, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 102206, China

Abstract **Objective** To evaluate the effect of laboratory used disinfectants against HBV DNA and HBsAg. **Methods** Viral suspension test was applied to the evaluation. HBsAg was detected by ELISA and HBV DNA was measured by real-time fluorescence PCR. **Results** For the sera with high concentration of HBV DNA and HBsAg, after 1 hour incubation with 1% Virkon, both HBV DNA and HBsAg turned negative. However, chlorinated disinfectant and 75% ethanol were merely effective against HBV sera with low concentration. Hydrogen peroxide had little effect towards all kinds of HBV sera. **Conclusion** The treatment by 20-40-fold volume of 1% Virkon for an hour was recommended when HBV positive sera splashed in the laboratory.

Key words Hepatitis B virus; Disinfectant; ELISA; Real-time PCR

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)隶属于嗜肝 DNA 病毒科,是一种直径 42nm 的双链 DNA 病毒^[1-3]。形态学上,HBV 由一个 27nm 的核衣壳和外层包裹的脂蛋白膜共同组成,病毒核酸(HBV DNA)位于核衣壳内,而 HBV 表面抗原(HBsAg)则镶嵌在外层的脂蛋白膜中^[4,5]。自然状态下,过量的 HBsAg 常以直径为 22nm 球形或管形颗粒在血液中循环^[6,7]。

HBV 对外界环境抵抗力较强,国内外常将 HBsAg 和 HBV DNA 作为反映病毒是否灭活的指标^[8-10]。很多文献证实,30~32℃ 环境下 HBV 可存活至少 6 个月,-20℃ 时可存活 15 年。在某些极端条件下,例如 121℃ 高压 20min、100℃ 干烤 1h 或者 100℃ 直接煮沸 10min 可确保灭活 HBV^[11-13]。然而,对于实验室溅洒、滴漏造成的 HBV 污染,高压干烤等方式显然并不适用。因此,探索各种不同的化学消毒剂对 HBV 的作用效果就显得尤为必要,之前有

研究资料表明,含氯制剂、环氧乙烷、戊二醛、过氧乙酸和碘伏对 HBV 的灭活效果比较好^[14-17]。本研究进一步评价了卫可(Virkon)、增效 H₂O₂ 等新型消毒剂对 HBV 的作用效果。

材料与方法

1. 实验材料:选择含氯消毒剂(有效氯浓度 135~165mg/L)、1% 卫可、75% 乙醇+增效剂、1.0% 过氧化氢+增效剂、1.5% 过氧化氢+增效剂 5 种,其中,含氯消毒剂购自南京净朗源环保科技有限公司,产品批号 20171214;维可购自美国杜邦公司;其余 3 种均购自北京华夏昱凯科技发展有限公司,产品批号分别为 201901、201902、201902。HBV 病毒原液来自于笔者实验室监测的急性乙型肝炎患者血清,保存于-20℃。原始血清中 HBsAg 含量为 3000IU/ml,HBV DNA 含量为 5×10⁶ IU/ml。

2. 实验方法:根据使用说明书先将待测消毒剂配制工作浓度,之后按照悬液法的操作步骤,取 100μl 含有 HBV 的患者血清样品与 100μl 各待测消毒剂等体积混合,室温下作用一定的时间,加入终浓度为 0.5% 硫代硫酸钠终止反应^[18,19]。消毒剂作用

基金项目:“十三五”国家科技重大专项基金资助项目(2018ZX10734-401)

作者单位:102206 北京,中国疾病预防控制中心病毒病预防控制所

通讯作者:周为民,电子信箱:doglet44@sina.com

终止后,通过万泰生物科技有限公司生产的 ELISA 检测试剂盒定性检测消毒剂作用后的 HBsAg 阴性,每份样品重复测定 3 次,记录 A 值,计算 3 次测定的平均值与阴性对照的比值,即 S/N 值, $S/N \geq 2.1$ 判断为阳性。另外,样品中病毒核酸的检测采用笔者所在科室自行建立的实时荧光定量 PCR 方法测定 Ct 值,每份样品重复测定 3 次,以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,评价 HBV DNA 的破坏情况。实时荧光定量 PCR 用到的引物以及探针序列如表 1 所示,引物和探针均由上海生工生物工程股份有限公司合成。

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物和探针

名称	序列(5'→3')	位置(参考株 V00866)
上游引物	AGT GTG GAT TCG CAC TCC T	2269 ~ 2287
下游引物	GAG TTC TTC TTC TAG GGG ACC TG	2387 ~ 2365
探针	FAM5' - CCA AAT GCC CCT ATC TTA TCA ACA CTT CC - 3'BHQ	2303 ~ 2331

表 2 病毒浓度(血清稀释度)对消毒剂作用效果的影响

血清稀释度		消毒剂种类				
		含氯消毒剂	1% 卫可	75% 乙醇 + 增效剂	1.0% 过氧化氢 + 增效剂	1.5% 过氧化氢 + 增效剂
1:10	HBsAg (S/N 值)	+(19.02)	+(26.79)	+(20.16)	+(21.58)	+(22.63)
	HBV DNA (Ct 值)	+(22.85 $\pm$ 0.23)	-(>40)	+(25.10 $\pm$ 0.12)	+(24.78 $\pm$ 0.11)	+(25.95 $\pm$ 0.07)
1:100	HBsAg (S/N 值)	+(22.58)	+(25.77)	+(20.45)	+(6.19)	+(13.71)
	HBV DNA (Ct 值)	+(33.56 $\pm$ 0.29)	-(>40)	+(28.32 $\pm$ 0.12)	+(28.72 $\pm$ 0.19)	+(29.20 $\pm$ 0.20)
1:500	HBsAg (S/N 值)	-(1.43)	-(1.31)	-(1.55)	+(6.10)	+(13.56)
	HBV DNA (Ct 值)	-(>40)	-(>40)	+(30.58 $\pm$ 0.31)	+(31.69 $\pm$ 0.22)	+(30.62 $\pm$ 0.17)
1:1000	HBsAg (S/N 值)	-(1.49)	-(0.87)	-(1.44)	+(6.50)	+(13.09)
	HBV DNA (Ct 值)	-(>40)	-(>40)	+(31.47 $\pm$ 0.25)	+(31.59 $\pm$ 0.11)	+(31.70 $\pm$ 0.13)

2. 不同剂量消毒剂对高浓度原始病毒的作用效果:为探索每种消毒剂最佳的使用剂量,分别使用了 2 倍、4 倍、10 倍、20 倍和 40 倍的消毒剂与原倍 HBV 阳性血清作用 1h,加入硫代硫酸钠中和后测定了

结 果

1. 病毒浓度(血清稀释度)对消毒剂作用效果的影响:由于实验室通常会面临不同浓度的 HBV 阳性血清的溅洒情况,这些血清的病毒载量以及 HBsAg 浓度往往有成百上千倍的差别,为了模拟不同病毒载量和 HBsAg 的血清对消毒效果的影响,将实验室保存的原始 HBV 阳性血清作了系列梯度稀释,经消毒剂作用 1h 后,对 HBsAg 和 HBV DNA 两个指标进行检测,发现不同消毒剂的作用效果存在差别。1.0% 的过氧化氢和 1.5% 的过氧化氢对高、中、低浓度的 HBV 阳性血清均无效,所有稀释度的血清经作用 1h 后 HBsAg 和 HBV DNA 仍然为阳性,含氯消毒剂和 75% 乙醇对低浓度的 HBV 阳性血清有一定的效果,但对高浓度血清无效,在本研究所涉及的 5 种消毒剂中,只有 1% 卫可对 HBV 核酸的破坏效果较为明显(表 2)。

HBsAg 和 HBV DNA 的含量。20 倍体积的 1% 卫可与原倍血清作用后可使 HBsAg 和 HBV DNA 两项指标均发生阴转,而其他两种消毒剂都达不到类似效果,增大至 40 倍体积后仍有指标为阳性,详见表 3。

表 3 不同剂量消毒剂对原倍 HBV 阳性血清的作用效果

消毒剂使用剂量		消毒剂种类		
		含氯消毒剂	1% 卫可	75% 乙醇 + 增效剂
2 倍	HBsAg (S/N 值)	+(73.99)	+(21.84)	+(44.24)
	HBV DNA (Ct 值)	+(20.06 $\pm$ 0.08)	+(27.11 $\pm$ 0.12)	+(23.87 $\pm$ 0.16)
4 倍	HBsAg (S/N 值)	+(70.52)	+(19.06)	+(12.96)
	HBV DNA (Ct 值)	+(21.89 $\pm$ 0.19)	+(36.38 $\pm$ 0.31)	+(24.97 $\pm$ 0.11)
10 倍	HBsAg (S/N 值)	+(70.05)	+(5.27)	+(7.17)
	HBV DNA (Ct 值)	+(23.75 $\pm$ 0.14)	-(>40)	+(26.15 $\pm$ 0.21)
20 倍	HBsAg (S/N 值)	+(66.85)	-(1.06)	-(1.58)
	HBV DNA (Ct 值)	+(25.61 $\pm$ 0.20)	-(>40)	+(27.18 $\pm$ 0.19)
40 倍	HBsAg (S/N 值)	+(40.31)	-(1.09)	-(1.37)
	HBV DNA (Ct 值)	-(>40)	-(>40)	+(28.36 $\pm$ 0.23)

3. 作用时间对消毒剂效果的影响:由于 1% 卫可消毒剂具有使用剂量较小、作用效果显著等特点,在实验室发生 HBV 阳性血清溅洒等生物安全事故时,其实用性要强于含氯消毒剂和 75% 乙醇。而表 3 的实验数据已经显示 20 倍和 40 倍体积 1% 卫可均能够彻底破坏 HBsAg 和 HBV DNA。在此基础上进一步探索了 20 倍以及 40 倍体积 1% 卫可的最佳处理时间,不论是 20 倍体积还是 40 倍体积,1% 卫可只有在作用 1h 之后才能使 HBsAg 和 HBV DNA 均发生阴转(表 4)。

表 4 作用时间对 1% 卫可消毒剂作用效果的影响

1% 卫可 使用剂量	作用时间 (min)	HBsAg (S/N 值)	HBV DNA (Ct 值)
20 倍体积	10	+ (10.19)	+ (33.82 ± 0.15)
	30	+ (5.66)	- (>40)
	60	- (1.35)	- (>40)
40 倍体积	10	+ (3.19)	+ (29.39 ± 0.17)
	30	+ (2.76)	- (>40)
	60	- (1.71)	- (>40)

讨 论

长期以来缺乏有效的 HBV 体外培养模型一直是 HBV 灭活效果评价的最大阻碍,虽然最近 HBV 的特异性受体及其体外培养系统取得了突破性的进展,但是该系统中使用的 HepG2 - NTCP 细胞株不易获得,而且 HBV 体外培养比较耗时费力,因此本研究选择了 HBsAg 和 HBV DNA 这两项广泛使用的指标用于评价不同消毒剂的作用效果,一方面是因为这两个指标的检测方法比较成熟,操作简便,价格低廉,检测结果稳定可靠,重复性强;另一方面,HBsAg 和 HBV DNA 作为 HBV 的两种重要组成成分,在一定程度上也能代表消毒剂对病毒本身的作用效果^[8,20]。

目前实验室常用的消毒剂种类繁多,性状各异,之前已有研究证实含氯消毒剂和乙醇处理后并不能使血清中的 HBsAg 抗原性达到阴性水平,这与本研究的实验结果相符^[14,15]。但是,本研究进一步发现,在血清中 HBsAg 含量较低的情况下(低于 30IU/ml),含氯消毒剂和乙醇的作用效果还是相当明显的,这两种实验室最常用的消毒剂对于低浓度的 HBsAg 具有较好的破坏作用。

除传统消毒剂之外,本研究还验证了卫可等新型消毒剂对 HBsAg 以及 HBV DNA 的作用效果。卫可外观为粉红色粉末,是一种过硫酸氢钾复合盐,属于酸性氧化剂,易溶于水,在实际使用中常配制成 1%

的溶液,卫可的消毒机制在于通过产生低分子自由基使病原表面蛋白质变性凝固从而杀灭微生物^[21,22]。本研究发现,无论是高浓度还是中低浓度的 HBV 阳性血清,使用 20 倍体积以上的 1% 卫可溶液处理 1h 之后均可使 HBV DNA 和 HBsAg 等指标转阴,证实了卫可良好的作用效果。除此之外,卫可相较于其余种类的消毒剂还具备显著的优点。首先,卫可配制方便,配好的溶液内含有特有的粉红色活性指示剂,可以通过颜色的变化判断消毒剂的有效性。其次,卫可挥发性不强,对人体皮肤、呼吸道黏膜和眼睛等部位的刺激较小,对金属的腐蚀作用也比含氯消毒剂要弱,基本安全无害。最后,卫可价格低廉,生产成本比医用乙醇等大多数的消毒剂要低。

综上所述,本研究通过 HBsAg 和 HBV DNA 等指标间接地评估了各种消毒剂的作用效果,研究结果对于实验室处理 HBV 阳性血清溅洒等生物安全事故具有一定的参考价值。采用最新的病毒体外培养体系,建立成熟可靠的评价方法来直接测定 HBV 的感染性是今后努力的方向。

参考文献

1 Zhao H. The epidemiology of hepatitis B virus infection in China[J]. J Viral Hepatitis, 2018, 25(12): 1624

2 Yanny B, Konyn P, Najarian LM, et al. Management approaches to hepatitis B virus vaccination nonresponse[J]. Gastroenterol Hepatol, 2019, 15(2): 93 - 99

3 Seto W, Lo Y, Pawlotsky J, et al. Chronic hepatitis B virus infection [J]. Lancet, 2018, 392(10161): 2313 - 2324

4 Costa J, Morais V, Goncalves JP, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with leprosy[J]. J Med Virol, 2019, 91(5): 775 - 780

5 Ayoub WS, Martin P, Bhamidimarri KR, et al. Hepatitis B virus infection and organ transplantation[J]. Gastroenterol Hepatol, 2018, 14(1): 33 - 40

6 Liu S, Zhou B, Valdes JD, et al. Serum hepatitis B virus RNA: a new potential biomarker for chronic hepatitis B virus infection[J]. Hepatology, 2019, 69(4): 1816 - 1827

7 Tseng TC, Huang LR. Immunopathogenesis of hepatitis B virus[J]. J Infect Dis, 2017, 216(suppl): S765 - S770

8 Arami S, Aghasadeghi M, Tabatabaie M, et al. The viral efficacy of three disinfectants on hepatitis B virus[J]. J Dent Med, 2015, 27(4): 259 - 264

9 朱泽航. 乙型肝炎病毒灭活检测方法的进展状况[J]. 河南预防医学杂志, 2015, 16(1): 62 - 63

10 Jursch C, Gerlich W, Glebe D, et al. Molecular approaches to validate disinfectants against human hepatitis B virus[J]. Med Microbiol Immunol, 2002, 190(4): 189 - 197

11 Kobayashi H, Tsuzuki M, Koshimizu K, et al. Susceptibility of hepa-

- titis B virus to disinfectants or heat[J]. J Clin Microbiol, 1984, 20(2): 214 – 216
- 12 Yasmine SE, Asmaa SH, Dalia KI, *et al.* Evaluation of a novel commercial quaternary ammonium compound for eradication of mycobacteria, HCV and HBV in Egypt[J]. J Microbiol, 2016, 54(1): 39 – 43
- 13 Wiedenmann A, Fischer B, Straub U, *et al.* Disinfection of hepatitis A virus and MS-2 coliphage in water by ultraviolet irradiation; comparison of UV – susceptibility[J]. Water Sci Technol, 2015, 27(3 – 4): 335 – 338
- 14 程斌, 卫波. 消毒剂对 HBsAg 灭活作用的评价[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(12): 1651 – 1652
- 15 桂勇, 曹何, 王俊, 等. 常用消毒剂对乙型肝炎表面抗原的破坏作用[J]. 重庆医科大学学报, 2000, 25(1): 65 – 67
- 16 Atkins N, Hodge W, Li B, *et al.* A systematic review regarding tonometry and the transmission of infectious diseases[J]. J Clin Med Res, 2018, 10(3): 159 – 165
- 17 Guo D, Li ZQ, Jia B, *et al.* Comparison of the effects of formaldehyde and gaseous ozone on HBV – contaminated hospital quilts[J]. Int J Clin Exp Med, 2015, 8(10): 19454 – 19459
- 18 董婕, 薄洪, 董丽波, 等. 3 种市售消毒剂对人感染高致病性禽流感 H5 亚型病毒杀灭效果的定量评价[J]. 中华微生物学和免疫学杂志, 2016, 36(6): 463 – 467
- 19 帖金凤, 张文福. 病毒灭活检测技术的研究进展[J]. 中国消毒学杂志, 2005, 22(4): 450 – 452
- 20 Thoa TH, Eunji J, Daniel T, *et al.* High environmental stability of hepatitis B virus and inactivation requirements for chemical biocides[J]. J Infect Dis, 2019, 219(7): 1044 – 1048
- 21 李雅瑾, 于娜, 李成杰. 两种消毒剂在牙科设施表面消毒效果的比较[J]. 中华现代护理杂志, 2012, 18(5): 545 – 546
- 22 Livia MV, Vanessa SP, Adilson JA, *et al.* Knowledge and prevalence of viral hepatitis among beauticians[J]. J Med Virol, 2014, 86(9): 1515 – 1521

(收稿日期: 2019 – 01 – 25)

(修回日期: 2019 – 11 – 13)

糖尿病患者内脏脂肪面积与糖尿病视网膜病变的相关性研究

柳怡莹 万 沁

摘 要 **目的** 探讨糖尿病患者内脏脂肪面积与糖尿病视网膜病变的关系。**方法** 选取 2017 年 9 月 ~ 2019 年 5 月在笔者医院治疗的 2 型糖尿病 (T2DM) 患者, 分为单纯 T2DM 组和糖尿病视网膜病变 (DR) 组, 其中单纯 T2DM 患者 887 例, DR 患者 214 例, 后者中非增殖期 (NPDR) 患者 156 例, 增殖期 (PDR) 患者 58 例, 糖尿病诊断依据符合 2014 年美国糖尿病学会 (ADA) 提出的 T2DM 诊断标准, DR 的分期标准符合我国眼底病学学会制订的 2014 年我国糖尿病视网膜病变临床诊疗指南。**结果** T2DM 患者内脏脂肪面积 ($84.99 \pm 39.33 \text{ cm}^2$) 与 DR 患者内脏脂肪面积 ($76.35 \pm 42.85 \text{ cm}^2$) 比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 内脏脂肪面积在 NPDR 和 PDR 患者之间比较, 差异无统计学意义 ($P > 0.05$); Logistic 回归分析显示, 病程、高血压、内脏脂肪面积是 DR 的相关因素 ($P < 0.05$), 内脏脂肪面积每增加 1 cm^2 , 糖尿病患者患糖尿病视网膜病变风险减少 1%, 性别、年龄、血脂、吸烟史、饮酒史等相关指标与糖尿病患者发生糖尿病视网膜病变无明显相关性 ($P > 0.05$)。**结论** 内脏脂肪面积是糖尿病视网膜病变发生的相关因素, 其与 DR 的发生具有相关性, 是 DR 发生的危险因素之一。

关键词 2 型糖尿病 内脏脂肪面积 糖尿病视网膜病变

中图分类号 R587

文献标识码 A

DOI 10.11969/j.issn.1673-548X.2020.05.016

Correlation between Visceral Fat Area and Diabetic Retinopathy in Diabetic Patients. Liu Yiying, Wan Qin. Affiliated Hospital of Southwest Medical University, Sichuan 646000, China

Abstract Objective To explore the relationship between visceral fat area and diabetic retinopathy. **Methods** Patients with type 2 diabetes mellitus (T2DM) who were treated in our hospital from September 2017 to May 2019 were selected and divided into the simple T2DM group and the diabetic retinopathy group (DR). Among them, 887 patients with simple T2DM and 214 patients with DR, including 156 patients with non – proliferative phase (NPDR) and 58 patients with proliferative phase (PDR) were selected. The diagnostic criteria for diabetes were in line with the T2DM diagnostic criteria proposed by the American diabetes society (ADA) in 2014, and the staging

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2016YFC0901200, 2016YFC0901205)

作者单位: 646000 泸州, 西南医科大学附属医院内分泌科

通讯作者: 万沁, 电子信箱: wanqin3@163.com