

• 论 著 •

不同乳汁成分乙型肝炎病毒 DNA 定量检测的结果分析*

汪东剑, 余维涛[△], 刘冬萍, 张晓云, 邱华琴, 刘 仙
(中国人民解放军第一八四医院输血科, 江西鹰潭 335000)

摘 要:目的 分析不同乳汁成分中乙型肝炎病毒(HBV)-DNA 定量检测的结果, 为乳汁标本 HBV-DNA 检测提供参考和依据。方法 对 152 例乙肝产妇乳汁分别选用混匀乳汁、乳酪、乳清和沉淀进行 HBV-DNA 定量检测。结果 选用不同的检测对象时, HBV-DNA 检测的阳性率差异无统计学意义($\chi^2=0.437, P=0.933$); HBV-DNA 载量间差异有统计学意义($F=2.835, P=0.043$), 沉淀中 HBV-DNA 载量高于乳清中 HBV-DNA 载量; 两两比较后, 混匀乳汁、乳酪、乳清间检测结果差异无统计学意义($P>0.05$), 混匀乳汁、乳酪、沉淀间检测结果差异无统计学意义($P>0.05$)。结论 对乳汁标本进行 HBV-DNA 定量检测时, 混匀乳汁可能是更为适合的检测对象。

关键词: 乳汁; 乙型肝炎病毒; DNA

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2016.24.007

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2016)24-3403-03

Analysis of hepatitis B virus DNA quantitative detection results in different breast milk compositions*

WANG Dongjian, YU Weitao[△], LIU Dongping, ZHANG Xiaoyun, QIU Huaqin, LIU Xian

(Department of Blood Transfusion, 184 Hospital of PLA, Yingtan, Jiangxi 335000, China)

Abstract: Objective To analyze the results of hepatitis B virus(HBV)-DNA quantitative detection in different breast milk components to provide reference and basis for the HBV-DNA quantitative detection of breast milk sample. **Methods** The HBV-DNA in the blending milk, cheese, whey and precipitation in 152 hepatitis B parturients was quantitatively detected. **Results** When choosing different detect objects, there was no statistically significant difference in HBV-DNA detection positive rate ($\chi^2=0.437, P=0.933$); the difference in HBV-DNA loads was statistically significant ($F=2.835, P=2.835$), the HBV-DNA loads in precipitation was higher than that in whey. There was no statistical significant difference in the pairwise comparison of the test results of blending milk, cheese and whey; also the difference of test results among blending milk, cheese and precipitation was not statistically significant ($P>0.05$). **Conclusion** In the HBV-DNA quantitative detection of breast milk sample, the blending milk may be more suitable detection object.

Key words: breast milk; hepatitis B virus; DNA

乙型肝炎病毒(HBV)可以通过血液、唾液、乳汁等传播, 母婴传播是 HBV 传播的重要途径。利用血清 HBV-DNA 定量检测体系对乳汁标本 HBV-DNA 进行检测已经广泛用于临床和试验研究^[1-3]。乳汁是一种较为特殊的体液, 经过自然沉淀或离心后形成以乳酪、乳清和沉淀为主的 3 种成分, 在乳汁 HBV-DNA 检测中, 不同的学者所选取乳汁成分各不相同, 多以乳清或者沉淀为对象进行检测^[4-6]。目前尚少见使用不同乳汁成分进行 HBV-DNA 检测结果一致性方面的报道, 故对于不同学者间的研究成果是否具有可比性存在疑虑。作者在将高载量 HBV-DNA 阳性定值血清掺入阴性乳汁建立的自制 HBV-DNA 阳性乳汁模型中发现, 同一样品不同乳汁成分中检测出的 HBV-DNA 载量并不一致^[7]。由于该模型中 HBV-DNA 是外来掺入乳汁中, 与真实乳汁中 HBV-DNA 的存在形式和分布情况可能存在差异, 为此本文对 152 例产妇乳汁标本选用不同成分作为研究对象进行 HBV-DNA 定量检测, 通过比较和分析检测结果, 试图发现不同乳汁成分 HBV-DNA 检测规律, 为临床和科研工作中选用适当的乳汁成分进行 HBV-DNA 检测提供依据和参考。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2014 年 10 月至 2015 年 12 月于本院妇产科分娩, 根据 2000 年全国病毒性肝炎学术会议修订的《病毒性肝炎防治方案》诊断标准确诊的 152 例乙肝产妇, 年龄 18~39 岁, 平均(26.07±4.81)岁。

1.2 方法

1.2.1 标本采集及处理 产后待初乳分泌后, 无菌操作采集 3~4 mL 乳汁于无菌干燥试管密封后-20℃保存待检。

1.2.2 乳汁不同成分的 HBV-DNA 检测 将收集到的待检乳汁标本按检测对象不同分为混匀乳汁组、乳酪组、乳清组、沉淀组, 各组 HBV-DNA 载量检测按以下方法进行: (1) 以混匀乳汁作为检测对象: 将乳汁标本充分混匀后, 取乳汁 200 μ L, 加入 450 μ L DNA 提取液和 4 μ L 内标溶液, 震荡混匀 15 s, 瞬时离心数秒后, 于 100℃干式恒温器处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min 备用; 取上清液 20 μ L 加入 HBV-PCR 反应管 12 000 r/min 离心数秒后上机扩增。 (2) 以乳酪、乳清、沉淀作为检测对象: 将乳汁标本 3 000 r/min 离心 10 min, 分别取乳酪层、中间乳清层、底部沉淀各 200 μ L, 加入 450 μ L DNA 提取液

* 基金项目: 南京军区医学科技创新课题资助项目(MS078)。

作者简介: 汪东剑, 男, 副主任技师, 主要从事临床检验与输血研究。 [△] 通讯作者, E-mail: dearwdj@163.com。

和 4 μ L 内标溶液,震荡混匀 15 s,瞬时离心数秒后,于 100 $^{\circ}$ C 干式恒温器处理 10 min;12 000 r/min 离心 5 min 备用;取上清液 20 μ L 加入 HBV-PCR 反应管 12 000 r/min 离心数秒后上机扩增。(3)结果分析按试剂盒操作说明书进行。

1.3 仪器与试剂 HBV-DNA 核酸定量检测使用中山大学达安基因股份有限公司生产的 DA-7600 核酸扩增仪及其配套 HBV-DNA 核酸定量检测试剂盒。

1.4 统计学处理 各检测结果 QDNA 均进行对数转化为 LGQDNA,采用 SPSS18.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用方差检验,多组数据均值两两比较采用 SNK 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同乳汁成分 HBV-DNA 检测结果 152 例乙肝产妇乳汁 HBV-DNA 检测阳性率见表 1,不同乳汁成分 HBV-DNA 检测阳性率间差异无统计学意义($\chi^2=0.437, P=0.933$)。所有乳汁成分 HBV-DNA 检测均为阳性者共 22 例,其不同成分 HBV-DNA 载量检测结果见表 1。对 4 种乳汁成分 HBV-DNA 载量结果进行方差检验,结果显示 4 种乳汁成分中 HBV-DNA 检测结果间差异有统计学意义($F=2.835, P=0.043$)。

表 1 乳汁不同成分 HBV-DNA 检测结果

乳汁成分	<i>n</i>	阳性(<i>n</i>)	阳性率(%)	HBV-DNA 载量 ($\bar{x}\pm s$, IU/mL)
混匀乳汁	152	24	15.8	4.08 \pm 0.81*
乳酪	152	22	14.5	3.96 \pm 0.68*
乳清	152	23	15.1	3.86 \pm 0.70*
沉淀	152	26	17.1	4.47 \pm 0.73*

注: * 表示所有成分 HBV-DNA 检测均为阳性的 22 例乳汁标本。

2.2 乳汁 HBV-DNA 载量分布情况 乳汁标本中,不同成分 HBV-DNA 载量分布情况见表 2,比较不同乳汁成分中 HBV-DNA 载量的分布情况发现,差异无统计学意义($\chi^2=8.499, P=0.204$)。

表 2 乳汁 HBV-DNA 载量分布情况 [*n*(%)]

载量区间 (IU/mL)	混匀乳汁	乳酪	乳清	沉淀
<2	128(84.2)	130(85.5)	129(84.9)	126(82.9)
2~<4	11(7.2)	12(7.9)	15(9.9)	7(4.6)
4~6	13(8.6)	10(6.6)	8(5.2)	19(12.5)

3 讨 论

由于 HBV-DNA 定量检测试剂盒说明书中,并未对乳汁标本的检测事项进行说明,虽然在《实时荧光 PCR 技术》中对于乳汁中布鲁菌和分枝杆菌 DNA 的提取分别选用乳汁整体和重悬后的沉淀作为对象^[8],但也未明确乳汁中 HBV-DNA 的提取方法,这使得多数学者在对乳汁标本进行 HBV-DNA 检测时,对选择检测对象缺乏有效的参考,也有不少学者尝试对乳汁标本进行前处理使其更适用于血清 HBV-DNA 检测体系^[9-10]。乳汁分泌后作为一种浑浊非匀质液体,需要检测的是

能代表其整体的 HBV-DNA 载量,本文之所以对乳汁进行离心选用乳清或者沉淀作为检测对象,多数是基于提高检测的准确性和阳性率的考虑。

在本研究中,使用混匀乳汁、乳酪、乳清、沉淀作为检测对象时,HBV-DNA 检测的阳性率间差异无统计学意义($\chi^2=0.437, P=0.933$),乳汁中不同成分 HBV-DNA 载量的分布情况间的差异也无统计学意义($\chi^2=8.499, P=0.204$)。阳性乳汁中检测出的 HBV-DNA 载量分布在 $10^2\sim 10^6$ IU/mL;但在乳清与沉淀中 HBV-DNA 载量的分布差异有统计学意义($\chi^2=7.234, P=0.007$);乳清中 HBV-DNA 载量主要分布在 $10^2\sim 10^4$ IU/mL,沉淀中 HBV-DNA 载量主要分布在 $10^4\sim 10^6$ IU/mL。

通过对 4 种乳汁成分 HBV-DNA 载量进行方差分析,发现检测结果间差异有统计学意义($F=2.835, P=0.043$)。为确定哪些成分的检测结果不同,本文继而进行 SNK 检验,结果显示:(1)混匀乳汁、乳酪、乳清间的检测结果差异无统计学意义($P>0.05$);(2)混匀乳汁、乳酪、沉淀间的检测结果差异无统计学意义($P>0.05$);(3)乳清与沉淀间的检测结果差异有统计学意义($P<0.05$),沉淀检测结果高于乳清检测结果。造成这一现象的原因考虑是因为乳汁中 HBV-DNA 主要以游离或物理吸附的形式存在于乳汁悬液和脂肪颗粒、沉淀物表面,通过离心病毒颗粒更多地吸附于沉淀或者脂肪颗粒表面,从而使得乳清中病毒颗粒的载量小于等体积沉淀中的载量;而这种物理吸附导致的差异幅度较小,使得乳清与混匀乳汁、沉淀与混匀乳汁中的 HBV-DNA 载量间差异无统计学意义($P>0.05$)。从定量检测结果和阳性率来看,混匀乳汁与乳清、混匀乳汁与沉淀间的差异均无统计学意义($P>0.05$),而其更能代表乳汁整体的情况,并且以乳汁整体作为检测对象已被用作布鲁菌中 HBV-DNA 检测的经典方法,因此考虑是否将混匀乳汁作为乳汁标本 HBV-DNA 检测的对象更为合适。

实际上乳汁经离心或静置后形成乳酪、乳清、沉淀三层,这三层并非由单一的组分组成,本文将上述三层分别转移至新的离心管后再次离心发现依然会形成乳酪、乳清和沉淀三层,说明简单的离心并不能将乳汁中的乳酪、乳清、沉淀严格地区分出来。以乳清作为检测对象的优势在于缺少了大多数脂肪颗粒和沉淀的影响,更接近于血清的物理形态,可能减少脂类、大颗粒物质对 HBV-DNA 提取和扩增的抑制作用。但在研究中发现,乳清中 HBV-DNA 的检测结果、阳性率与混匀乳汁间差异无统计学意义($P>0.05$),说明乳清并不比混匀乳汁作为检测对象有明显优势。以沉淀作为检测对象主要是参考分枝杆菌中 HBV-DNA 提取方法,期望通过离心能使得乳汁中 HBV-DNA 主要富集在沉淀中,从而提高检测的阳性率。然而本研究发现经过离心后,沉淀中 HBV-DNA 检测的阳性率并不高于混匀乳汁,定量检测结果与混匀乳汁间的差异也无统计学意义($P>0.05$)。以乳酪作为检测对象进行 HBV-DNA 检测很少见于报道,绝大多数学者都是采用弃上层脂质,取乳清/沉淀进行 HBV-DNA 检测,这是基于大家普遍认为乳酪中的大量的脂类将会对 HBV-DNA 检测造成较为明显的抑制作用。在本研究中却发现,乳酪中不仅能够检测出 HBV-DNA,而且与其他乳汁成分相比 HBV-DNA 检测阳性率、检测结果间的差异无统计学意义($P>0.05$)。不过,依然不建议将乳酪作为

HBV-DNA 的检测对象,因为:(1)乳酪容易吸附在微量吸嘴内壁及外壁,使得其存在加样不准确的可能,从而影响检测结果的准确性和重复性;(2)吸取乳酪时难免会混入部分乳清,使得检测结果并不能完全代表乳酪中 HBV-DNA 的载量情况。本文建议将混匀乳汁作为乳汁中 HBV-DNA 检测对象基于以下考虑:(1)方法简单,无需离心或者自然沉淀的过程;(2)将乳汁成分可能对 HBV-DNA 检测的影响均匀分摊,使其检测结果与真值间的差异不会过大;(3)尽量使 HBV-DNA 在乳汁中分布均匀,从而使得检测结果更能代表乳汁中 HBV-DNA 载量的真实情况;(4)加样准确,不易因加样误差而影响检测结果。

乳汁标本中 HBV-DNA 定量检测方法的标准化还有许多问题需要解决。本次研究的结果仅能反映出乳汁中不同成分 HBV-DNA 检测结果间的差异,由于缺乏专用的乳汁 HBV-DNA 检测质控品,使得对于检测出的不同乳汁部分中 HBV-DNA 结果的准确性缺乏判断依据。同时,由于本次研究中 HBV-DNA 阳性乳汁例数较少,乳汁中不同成分 HBV-DNA 检测结果的差异仍需要通过更多标本的检测、更完善的试验设计来探讨和研究。

参考文献

- [1] 张静,黄晨艳. 553 例产妇血清、乳汁、唾液中乙型肝炎病毒-DNA 载量的检测及相关性研究[J]. 实用妇产科杂志, 2012,28(4):294-297.
- [2] 何佳英,张迎华,张永乐,等. 乙型肝炎病毒感染产妇乳汁

中乙型肝炎病毒 DNA 载量对母乳喂养的指导意义 [J]. 中华预防医学杂志,2011,45(11):1004-1006.

- [3] 李文郎,刘卫东,吴爱成,等. 不同 HBV 感染模式产妇血清及乳汁 HBV-DNA 检测结果分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(4):400-401.
- [4] 彭其才,许成芳,滕奔琦,等. 产妇血清 HBV-DNA 含量对乳汁和新生儿血清 HBV-DNA 浓度的影响[J]. 中山大学学报(医学科学版),2010,31(5):729-731.
- [5] 龙波,吕微,魏秀丽. 125 例乙肝病毒携带产妇乳汁 HBV-DNA 与血清 HBV-DNA 水平的相关性分析[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(4):495-496.
- [6] 张文萍,石荷英,李彩彬等. 探讨携带乙型肝炎病毒产妇母乳喂养安全性检测评价指标[J]. 中华实验和临床病毒学杂志,2013,27(3):202-203.
- [7] 汪东剑,张晓云,江丁. 乳汁成分对乙型肝炎病毒 DNA 检测的影响[J]. 海南医学,2013,24(16):2409-2411.
- [8] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2011:68-70.
- [9] 李国玉,陈勇. 乳汁前处理对乙型肝炎病毒 DNA 检测结果的影响[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(7):802-803.
- [10] 温旺荣,苏芳. 乳汁处理方法对检测 HBV DNA 结果的影响[J]. 临床检验杂志,2007,25(1):31.

(收稿日期:2016-09-05 修回日期:2016-10-24)

(上接第 3402 页)

胺培南除外)的耐药率均明显高于单产 AmpC 酶的 3 种表型菌株的耐药率($P<0.05$),提示阴沟肠杆菌在产 ESBLs 的同时存在产 AmpC 酶的话,会使细菌对抗菌药物的耐药性明显提高。

综上所述,产 AmpC 酶和 ESBLs 的阴沟肠杆菌存在的多重耐药问题给临床抗感染治疗及控制耐药菌株的产生带来极大困难,及时、准确地检测阴沟肠杆菌产 AmpC 酶和 ESBLs 情况可以了解其耐药机制,对临床抗感染治疗有重要意义。当前检测 AmpC 酶的方法多种多样,但还没有一种国际公认的标准方法,有待广大的科研人员研究出一种简单、快速而准确的检测方法。

参考文献

- [1] 刘琪,杨山虹,孙各琴,等. 阴沟肠杆菌医院感染分布及耐药性分析[J]. 中国病原生物学杂志,2012,7(2):149-151.
- [2] 王凤霞,宿振国. 阴沟肠杆菌对临床常用抗菌药物耐药机制的研究进展[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2013,40(2):133-135.
- [3] 明德松,吴一波,谢尊金. 多底物协同一拮抗法同时检测超广谱 β -内酰胺酶和 AmpC β -内酰胺酶[J]. 中国感染控制杂志,2003,2(4):286-288.
- [4] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 3 版. 南京:东南大学出版社,2006:357-360.

- [5] 中华医学会. 抗菌药物敏感性试验执行标准[J]. 中华检验医学杂志,2013,33(1):21-23.
- [6] Jeong HS, Bae IK, Shin JH, et al. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance and its association with extended-spectrum beta-lactamase and AmpC beta-lactamase in Enterobacteriaceae[J]. Korean J Lab Med, 2011, 31(4):257-264.
- [7] 陆丹倩,顾向明,邓冲,等. 阴沟肠杆菌高产 AmpC 酶和 ESBLs 的检测及其多重耐药研究[J]. 国际检验医学杂志,2013,34(7):870-872.
- [8] 赵德军,胡昭宇,武静,等. 产 AmpC 酶及 ESBLs 阴沟肠杆菌的检测及耐药性分析[J]. 国际检验医学杂志,2011,32(10):1118-1119.
- [9] 杨月琳. 产 AmpC 酶阴沟肠杆菌的检测[J]. 中国实验诊断学,2008,12(7):933-935.
- [10] Tenover FC, Mohammed MJ, Gorton TS, et al. Detection and reporting of organisms producing extended-spectrum beta-lactamases: survey of laboratories in Connecticut[J]. J Clin Microbiol, 1999, 37(12):4065-4070.
- [11] 王玉春. β -内酰胺类抗生素诱使阴沟肠杆菌产生 β -内酰胺酶的研究[J]. 华夏医学,2010,23(1):96-98.

(收稿日期:2016-09-01 修回日期:2016-10-20)