

• 论 著 •

qRT-PCR 法用于检测模拟环境表面载体 HBV DNA 的可行性研究^{*}

陶西萍¹, 来春艳^{1△}, 赵娜¹, 魏晨波¹, 薛卫宁¹, 郭晓波²

陕西省西安市中心医院:1. 医院感染管理科;2. 血液病研究所, 陕西西安 710003

摘 要:目的 探讨实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR 法)用于检测模拟环境表面载体乙型肝炎病毒(HBV)DNA 的可行性。方法 用 4 种浓度的 HBV 标准品 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 IU/mL 污染载体, 放置 3 d 和 7 d, 采用 qRT-PCR 法, 检测 HBV 载体表面 HBV DNA 浓度。结果 5×10^3 IU/mL 标准品污染后的 HBV 载体, 放置 3 d 后阳性检出率为 70.0%, 7 d 后的阳性检出率为 80.0%; 其余 3 种浓度的标准品污染后的载体放置 3、7 d 的阳性检出率均为 100.0%。4 种浓度的标准品污染后的载体放置 3 d 后检测 HBV DNA 浓度差异有统计学意义($F=8.327, P<0.001$); 4 种浓度的标准品污染后的载体放置 7 d 后检测 HBV DNA 浓度差异有统计学意义($F=7.302, P=0.001$)。4 种浓度的标准品污染后的载体放置 3 d 后 HBV DNA 浓度下降值与放置 7 d 后的下降值进行比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。结论 qRT-PCR 法可以应用于医疗机构环境表面 HBV 污染状况的检测; HBV 污染浓度越高, HBV DNA 浓度越高; 病毒污染载体后, 放置 7 d 仍可检出 HBV DNA。

关键词:实时荧光定量 PCR; 环境表面; 乙型肝炎病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2021.08.010

中图法分类号:R183.7

文章编号:1673-4130(2021)08-0937-04

文献标志码:A

Feasibility study of using qRT-PCR in detection HBV DNA on simulated environmental surface carrier^{*}

TAO Xiping¹, LAI Chunyan^{1△}, ZHAO Na¹, WEI Chenbo¹, XUE Weining¹, GUO Xiaobo²

1. Department of Hospital Infection Management; 2. Institute of Hematology, Xi'an Central Hospital, Xi'an, Shaanxi 710003, China

Abstract: Objective To explore the feasibility of using the real time fluorescent quantitative PCR (qRT-PCR) in detection of hepatitis B virus (HBV) DNA on simulated environmental surface carrier. **Methods** HBV standards at different concentrations of 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 and 5×10^3 IU/mL were used to contaminate the carriers, using the qRT-PCR to detect the HBV DNA on the carriers after 3 and 7 days. **Results** The positive rate was 70.0% and 80.0% after 3 days and 7 days on the carriers contaminated by 5×10^3 IU/mL of HBV standard. The rates were all 100.0% on other carriers after 3 and 7 days contaminated by the other three concentrations of standard substance. The detect concentrations were statistically significant different in four concentrations of HBV carriers after 3 days of contamination ($F=8.327, P<0.001$). The detect concentrations were statistically significant difference in four concentrations HBV carriers after 7 days of contamination ($F=7.302, P=0.001$). There were no statistically significant differences between the HBV DNA concentration reductions in four concentrations of HBV carriers after 3 and 7 days ($P>0.05$). **Conclusion** The qRT-PCR method can be used to the detect HBV contamination on the environmental surface in medical institutions. The higher the concentration of HBV contamination, the higher the detection concentration of HBV DNA. The HBV DNA on carriers can still be detected after 7 days of contamination.

Key words: real time fluorescent quantitative PCR; environmental surface; hepatitis B virus

感染性疾病病原体可以通过呼吸道、接触等途径传播, 污染的环境表面是间接接触传播的重要媒介, 特别是在传染病流行期间, 公共场所、医疗机构环境表面的污染状况及传播风险不容忽视, 有文献报道,

在手足口病/疱疹性咽峡炎独立接诊候诊区, 医院环境肠道病毒污染阳性率为 47.50%, 环境表面肠道病毒污染有传播的风险, 但我国尚无环境表面病毒污染状况检测标准, 探索科学、可行的检测方法成为一项

^{*} 基金项目: 陕西省重点研发计划项目(2018SF-148)。

作者简介: 陶西萍, 女, 副主任医师, 主要从事医院感染防控的研究。△ 通信作者, E-mail: 752156412@qq.com。

本文引用格式: 陶西萍, 来春艳, 赵娜, 等. qRT-PCR 法用于检测模拟环境表面载体 HBV DNA 的可行性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2021, 42(8): 937-939.

重要课题^[1]。有学者运用 ELISA 法检测环境表面乙型肝炎病毒(HBV)表面抗原(HBsAg)来证实环境表面存在 HBV 污染,但无法判断检测样本是否具有感染能力,对于环境表面的清洁消毒、感染防控指导意义较小^[2-3]。实时荧光定量 PCR 法(qRT-PCR 法)目前已广泛用于临床血液样本中多种病毒的检测,但由于无相关技术标准,较少用于环境表面病毒的检测^[4]。本研究用 HBV 载体模拟环境表面,并探索性应用 qRT-PCR 法检测 HBV DNA,以验证 qRT-PCR 法用于环境表面病毒核酸检测的可行性。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 采样液(天津灏洋华科生物科技有限公司生产,主要成分为氯化钠、氯化钾、葡萄糖、磷酸氢二钠、磷酸二氢钾、庆大霉素及两性霉素)、生理盐水;4 种 HBV 标准品(浓度分别为 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 IU/mL);HBV 核酸测定试剂盒(荧光 PCR 法,上海之江生物科技股份有限公司);Autrax 全自动核酸提取站;SLAN-96P 型荧光定量 PCR 仪等。

1.2 方法

1.2.1 环境表面 HBV 载体的制备 载体制备:将非光滑的 PVC 塑料板剪成 $5\text{ cm} \times 5\text{ cm}$ 大小,首先用流动水清洗,2 000 mg/L 含氯消毒剂浸泡 30 min 后清洗、擦拭、晾干后作为试验对象。HBV 载体制备:应用移液枪分别吸取 5×10^6 、 5×10^5 、 5×10^4 、 5×10^3 IU/mL 的 HBV 标准品 100 μL 于不同载体上,用棉签涂抹均匀,自然干燥,制备成 4 种浓度 HBV 标准品污染的载体。选用两种浓度(5×10^6 IU/mL 和 5×10^4 IU/mL)的 HBV 标准品污染的载体,分别用运送培养基和生理盐水进行采样,相同浓度、相同采集液重复 3 次,共计 12 个标本,检测载体表面 HBV DNA 浓度,取均值进行比较分析。

1.2.2 采样方法 参照医院消毒卫生标准中物体表面微生物采样方法^[5],用浸有运送培养基棉拭子 1 支,在模拟载体表面横竖往返各涂抹 5 次,并随之转动棉拭子,折去手接触部分,将棉拭子放入 1 mL 运送培养基中密闭送检。

1.2.3 检测方法 采用 qRT-PCR 法检测。所有采集的标本均在 24 h 内进行检测,检测前将标本置于微量振荡器上震荡 1 min,充分混匀后,按照 HBV 核酸测定试剂盒(qRT-PCR 法)及 PCR 扩增仪使用指导

书规定的方法进行,测定 1 次即为结果。整个试验操作均严格按照操作规范进行,同时做内参、阴性和阳性对照,均在控。该试剂的线性检测范围为($1 \times 10^2 \sim 1 \times 10^8$)IU/mL,最低检出限为 20 IU/mL,若检测结果超出检测范围,予以复测并取平均值。

1.3 统计学处理 利用 Excel 录入数据;采用 SPSS21.0 对数据进行分析。计量资料以均值表示,组间比较采用 *t* 检验或方差分析;计数资料采用百分数表示,组间比较采用 χ^2 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 采用不同采样液时 HBV DNA 检出情况 以运送培养基为采样液,两种浓度(5×10^6 、 5×10^4 IU/mL)的标准品污染的载体表面 HBV DNA 阳性检出率均为 100%,检测浓度的均值分别为 6.81×10^3 IU/mL 和 5.33×10 IU/mL;以生理盐水为采样液,两种浓度(5×10^6 、 5×10^4 IU/mL)的标准品污染的载体表面 HBV DNA 阳性检出率均分别为 100.0%和 66.7%,检测浓度的均值分别为 9.79×10^2 IU/mL 和 1.86×10 IU/mL。以运送培养基为采样液的检出率均大于或等于以生理盐水为采样液者。见表 1。

2.2 不同浓度标准品污染的载体放置 3、7 d 的 HBV DNA 阳性检出率 4 种浓度的标准品污染的载体各 20 份,其中 10 份放置 3 d、10 份放置 7 d,检测载体表面 HBV DNA 浓度,样本合计 80 份。检测结果显示,HBV DNA 总阳性检出率为 93.8%(75/80)。所有载体放置 3 d 的总阳性检出率为 92.5%(37/40),放置 7 d 的总阳性检出率为 95.0%(38/40),阳性检出率差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

2.3 不同浓度标准品污染的载体放置 3、7 d 的 HBV DNA 浓度比较 4 种浓度的标准品污染的载体放置 3 d 后,载体表面检出的 HBV DNA 浓度均值分别为 3.109×10^5 、 3.607×10^4 、 4.301×10^3 、 2.940×10^2 IU/mL,差异有统计学意义($F = 8.327$, $P < 0.001$);放置 7 d 后,载体表面检出的 HBV DNA 浓度均值分别为 2.874×10^5 、 2.450×10^4 、 1.554×10^3 、 1.683×10^2 IU/mL,差异有统计学意义($F = 7.302$, $P = 0.001$)。对 4 种浓度的标准品污染的载体放置 3 d 后 HBV DNA 浓度下降值与放置 7 d 后的下降值进行比较,差异均无统计学意义($P > 0.05$)。见表 3。

表 1 以运送培养基和生理盐水为采样液时不同浓度的标准品污染的载体表面 HBV DNA 的检出情况

采样液	HBV 载体		HBV DNA 检出情况		
	浓度(IU/mL)	数量(<i>n</i>)	检测阳性数(<i>n</i>)	阳性检出率(%)	检出浓度的均值(IU/mL)
运送培养基	5×10^6	3	3	100.0	6.81×10^3
	5×10^4	3	3	100.0	5.33×10
生理盐水	5×10^6	3	3	100.0	9.79×10^2
	5×10^4	3	1	66.7	1.86×10

表 2 载体放置 3、7 d 后 HBV DNA 阳性检出情况

载体浓度(IU/mL)	放置 3 d			放置 7 d			总阳性检出率 (%)	χ^2	P
	n	阳性数(n)	阳性检出率(%)	n	阳性阳性数(n)	检出率(%)			
5×10 ⁶	10	10	100.0	10	10	100.0	100.0	0.000	1.000
5×10 ⁵	10	10	100.0	10	10	100.0	100.0		
5×10 ⁴	10	10	100.0	10	10	100.0	100.0		
5×10 ³	10	7	70.0	10	8	80.0	75.0		
合计	40	37	92.5	40	38	95.0	93.8		

表 3 载体放置 3、7 d 的 HBV DNA 浓度(IU/mL)

载体浓度	放置 3 d 的检测浓度	放置 7 d 的检测浓度	d ₁	d ₂	t	P
5×10 ⁶	3.109×10 ⁵	2.874×10 ⁵	4.689×10 ⁶	4.713×10 ⁶	−0.162	0.873
5×10 ⁵	3.607×10 ⁴	2.450×10 ⁴	4.639×10 ⁵	4.755×10 ⁵	−0.754	0.461
5×10 ⁴	4.301×10 ³	1.554×10 ³	4.570×10 ⁴	4.845×10 ⁴	−1.796	0.098
5×10 ³	2.940×10 ²	1.683×10 ²	4.706×10 ³	4.832×10 ³	−1.061	0.303
F	8.327	7.302				
P	<0.001	0.001				

注:d₁=载体浓度－载体放置 3 d 的检测浓度;d₂=载体浓度－载体放置 7 d 的检测浓度。

3 讨 论

病毒在环境表面的污染状况受到越来越多的专业人员及社会关注,特别是在病毒相关感染性疾病流行期间。我国《公共场所卫生指标与限值要求》中无环境表面卫生指标;《医院消毒卫生标准》中物体表面卫生标准中无病毒检测要求及病毒检测方法;疾病预防控制中心等部门在对医疗机构、公共场所的日常检测中也未开展病毒检测。尹海等^[6]、李存桂等^[7]、陈美珍等^[8]学者应用 ELISA 法对医疗机构环境表面行 HBsAg 检测,证实了环境表面存在 HBV 病毒污染,但不能证实是否存在传染的风险。检出 HBV DNA 是病毒复制和传染性的最可靠的指标,PCR 技术检测病毒核酸对于评价病毒污染比 ELISA 法检测抗原、抗体更有意义,更能评估病毒传染的风险。

本研究用 HBV 标准品污染载体模拟环境表面,并探索性应用 qRT-PCR 法检测病毒 DNA。qRT-PCR 法与常规 PCR 法相比,其灵敏度更高,检测限可低至 20 IU/mL。由于 qRT-PCR 法目前主要用于临床血清、体液标本的检测,本研究选用 4 种浓度标准品污染载体,最低浓度(5×10³ IU/mL)污染的载体放置 7 d 仍可检出 HBV DNA,说明该检测方法用于环境表面标本等非人体标本检测具有一定可行性。

既往环境表面细菌学检测采样液多为生理盐水,因无环境表面病毒检测技术标准,本研究应用的病毒运送培养基是以氯化钠和葡萄糖为主要原料,通常用于对人体血清、体液等标本进行病毒检测,尚未用于环境表面;因此,本研究分别采用生理盐水及运送培养基作为采样液进行试验,结果显示,采样液为运送培养基时,载体表面 HBV DNA 的阳性检出率较高,因此可以选择运送培养基为环境表面 HBV 污染状况的采样液。此外,病毒运送培养基采样液为 3~6 mL,经查阅文献,宋向阳等^[9]对胃镜表面 HBV 污染

状况进行采样时,选择 1 mL 的采样液,因此最终选用 1 mL 采样液,既保证了检测需求,又可提高检出率。

HBV 感染者在医疗机构内进行手术、穿刺及各种治疗,极易将血液、体液喷溅、沾染到环境表面^[10],若未进行有效的清洁消毒处理,可能存在较长时间的污染,有一定的感染风险。有研究者报道,HBV 可以在外部环境中存活 7 d^[11],本研究结果显示,qRT-PCR 法在放置 3 d 和 7 d 的 HBV 载体表面仍能检测出 HBV DNA,充分证明了 qRT-PCR 法用于污染一定时间后的环境表面病毒核酸检测的可行性。新型冠状病毒肺炎疫情期期间,疾病预防控制中心、部分医疗机构也尝试性地在部分医疗机构、公共场所进行了病毒核酸定性检测^[12-13],本研究采用 qRT-PCR 法定量检测污染载体的 HBV DNA,该研究方法可应用于其他病毒污染的环境表面的检测,结果可为有关部门制订环境表面病毒检测技术标准提供参考依据。

参考文献

[1] 艾静,嵇红,王欣烨,等. 江苏省两地手足口病/疱疹性咽峡炎相关肠道病毒外环境调查[J]. 现代预防医学,2020,47(10):1758-1761.

[2] 张小青. 口腔科门诊及内镜室器械 HBsAg 污染情况调查[J]. 中国感染控制杂志,2004,3(3):271.

[3] 钟春梅,葛元输,韩剑丽,等. 口腔正畸器械污染状况及其消毒质量监督[J]. 中国消毒学杂志,2012,29(11):979-980.

[4] 万咏梅,王富珍,张国民,等. 成人乙型肝炎感染风险和疾病负担[J]. 中国疫苗和免疫,2019,25(5):611-616.

[5] 胡国庆,段亚波. GB15982-2012《医院消毒卫生标准》内容解读(一)[J]. 中国消毒学杂志,2013,30(7):649-652.

[6] 尹海,曹承南,祝宏,等. 口腔印模乙肝病毒污染的临床探讨[J]. 口腔颌面修复学杂志,2003,4(2):120-122.

[7] 李存桂,冯伊平. 护理管理在口腔科门(下转第 944 页)

综上所述, HSP 患儿血清中 OPN、ST2 异常升高, VitA、25-(OH)D3 缺乏可加重免疫功能紊乱, OPN、ST2 水平升高, VitA、25-(OH)D3 水平降低是 HSP 发病的危险因素, 或可作为临床诊断 HSP 的辅助指标。

参考文献

[1] ALBARAMKI J. Henoch-schonlein purpura in childhood a fifteen-year experience at a tertlary hospital[J]. J Med Liban, 2016, 64(1): 13-17.

[2] 荆仕娟, 周伟, 张智敏, 等. 不同剂量雷公藤多苷联合复方丹参对过敏性紫癜性肾炎患者凝血功能及内皮细胞功能的影响[J]. 现代生物医学进展, 2019, 19(9): 1692-1696.

[3] FRENZEL D F, BORKNER L, SCHEURMANN J, et al. Osteopontin deficiency affects imiquimod-induced psoriasis-like murine skin inflammation and lymphocyte distribution in skin, draining lymph nodes and spleen[J]. Exp Dermatol, 2015, 24(4): 305-307.

[4] WANG Y P, WANG J H, WANG X L, et al. Roles of ST2, IL-33 and BNP in predicting major adverse cardiovascular events in acute myocardial infarction after percutaneous coronary intervention[J]. J Cell Mol Med, 2017, 21(11): 2677-2684.

[5] MEDRANO M, CARRILLO-CRUZ E, MONTERO I, et al. Vitamin D: Effect on Haematopoiesis and Immune System and Clinical Applications[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(9): 2663.

[6] 中华医学会儿科学分会免疫学组. 儿童过敏性紫癜循证诊治建议[J]. 中华儿科杂志, 2013, 51(7): 502-507.

[7] YANG H R. What We Know about Henoch-Schönlein Purpura in Children up to Date? [J]. J Korean Med Sci, 2018, 33(25): e199.

[8] 林林东, 王晓冬, 龚姪, 等. 过敏性紫癜患儿免疫球蛋白及 T 淋巴细胞亚群水平与疾病严重程度的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(13): 1651-1653.

[9] BARCHETTA I, ALESSANDRI C, BERTOCCINI L, et al. Increased circulating osteopontin levels in adult patients with type 1 diabetes mellitus and association with dysmetabolic profile[J]. Eur J Endocrinol, 2016, 174(2):

187-192.

[10] 金汶, 吴成. OPN 和 NF-κB 在过敏性紫癜患者血清中表达水平的变化及意义[J]. 华中科技大学学报(医学版), 2015, 44(2): 229-231.

[11] 王丹, 康天. 过敏性紫癜患儿血清 OPN、NF-κB 含量检测及其与氧化应激、细胞免疫功能的相关关系[J]. 海南医学院学报, 2018, 24(10): 1027-1029.

[12] SHIRAKAWA K, YAN X, SHINMURA K, et al. Obesity accelerates T cell senescence in murine visceral adipose tissue[J]. J Clin Invest, 2016, 126(12): 4626-4639.

[13] AIMO A, JANUZZI J L, BAYES-GENIS A, et al. Clinical and Prognostic Significance of sST2 in Heart Failure: JACC Review Topic of the Week[J]. J Am Coll Cardiol, 2019, 74(17): 2193-2203.

[14] EMDIN M, AIMO A, VERGARO G, et al. sST2 Predicts Outcome in Chronic Heart Failure Beyond NT-proBNP and High-Sensitivity Troponin T[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72(19): 2309-2320.

[15] CHEN T, JIA R Z, GUO Z P, et al. Elevated serum interleukin-33 levels in patients with Henoch-Schönlein purpura[J]. Arch Dermatol Res, 2013, 305(2): 173-177.

[16] XU J, GUARDADO J, HOFFMAN R, et al. IL33-mediated ILC2 activation and neutrophil IL5 production in the lung response after severe trauma: A reverse translation study from a human cohort to a mouse trauma model[J]. PLoS Med, 2017, 14(7): e1002365.

[17] 董显燕, 钟涛, 黄郁波, 等. 血清 25-羟维生素 D 与过敏性紫癜发病风险关系的病例对照研究[J]. 重庆医学, 2017, 46(8): 1076-1078.

[18] 陈宝伶. 儿童过敏性紫癜与维生素 A、D、E 水平的相关性研究[J]. 中国现代医生, 2017, 55(31): 17-20.

[19] 范丽, 刘衡, 王予川, 等. 血清维生素 D 水平与过敏性紫癜患儿病情及治疗的关系[J]. 中国当代儿科杂志, 2017, 19(7): 796-799.

[20] 邹敏书, 宋秋菊, 聂国明, 等. 维生素 D 对过敏性紫癜患儿免疫功能的调节作用[J]. 解放军药学报, 2017, 33(4): 307-310.

(收稿日期: 2020-09-21 修回日期: 2020-12-19)

(上接第 939 页)

诊医院感染控制中的作用[J/CD]. 世界最新医学信息文摘(电子版), 2016, 16(34): 278-279.

[8] 陈美珍, 于军, 杨双旺, 等. 乙型肝炎病毒污染血液操作台面的调查分析[J]. 中华医院感染学杂志, 2006, 16(8): 880-881.

[9] 宋向阳, 李武平, 马春丽, 等. 三种消毒剂对胃镜污染乙肝病毒去除效果的实验研究[J]. 中国消毒学杂志, 2015, 32(3): 232-234.

[10] 陈珍. 沾染 HBV 床单位的消毒效果研究及新型防污染床单位的设计[D]. 重庆: 重庆医科大学, 2016.

[11] AXEL K, INGEBORG S, GÜNTER K. How long do nos-

ocomial pathogens persist on inanimate surfaces? A systematic review[J]. BMC Infect Dis, 2006, 6: 130.

[12] 曹玲, 何树森, 李青峰, 等. 新型冠状病毒肺炎患者所在负压病房物体表面核酸检测有效性评估[J]. 中国消毒学杂志, 2020, 30(7): 535-536.

[13] GUO Z, WANG Z, ZHANG S, et al. Aerosol and Surface Distribution of Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 in Hospital Wards, Wuhan, China, 2020 [J]. Emerg Infect Dis, 2020, 26(7): 1586-1591.

(收稿日期: 2020-09-22 修回日期: 2020-11-17)