

粪便中乙肝病毒的定量检测及其与乙肝病毒标志物的相关性研究

周翔天^{1,2}, 吕 茹^{1,2}, 郑吉顺³, 陈国胜^{1,2}, 刘艳艳^{1,2}, 叶 英^{1,2}, 李家斌^{1,2}

摘要 采集 50 例乙型肝炎未并发消化道出血患者的血液和粪便标本,采用酶联免疫法检测粪便和血清中乙肝病毒标志物(HBVM),QIAmp DNA Stool kit 试剂盒法提取粪便总 DNA,巢式 PCR 定性检测粪便中乙肝病毒 DNA(HBV-DNA),实时荧光定量 PCR(FQ-PCR)定量检测血清和粪便中 HBV-DNA。根据血清 HBVM 阳性的不同组合(感染模式)将 50 例患者分成 3 组,粪便乙肝表面抗原(HBsAg)阳性 37 例,血清 HBsAg 阳性 46 例,两者检出率差异有统计学意义($P < 0.05$)。1 例血清阴性者,粪便中 HBsAg 阳性。FQ-PCR 定量检测血清和粪便 HBV-DNA 含量分别为 4.35 ± 1.49 和 4.50 ± 1.59 。血清 HBV-DNA 检测,30 例阳性(60%),粪便中 HBV-DNA 共检测出 31 例阳性(62%)。

关键词 HBV-DNA;乙型肝炎病毒标志物;粪便;FQ-PCR;巢式 PCR

中图分类号 R 512.6

文献标志码 A 文章编号 1000-1492(2014)10-1510-04

2014-05-19 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(编号:81172737)

作者单位:¹安徽医科大学第一附属医院感染科,合肥 230022

²安徽省细菌耐药监控中心,合肥 230022

³合肥市第一人民医院,合肥 230012

作者简介:周翔天,男,硕士研究生;

李家斌,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者,E-mail: lijabin948@vip.sohu.com

乙肝病毒(hepatitis B Virus, HBV)的非肠道传染方式早在 70 年代初就被国内外学者所公认。但近几年来也有报道^[1]表明在人的胃液中检测出 HBV,而且许多乙型肝炎患者存在家族中乙肝表面抗原(hepatitis B surface antigen, HBsAg)阳性的聚集现象,同时发病前并无输血、注射或针刺史。表明 HBV 的肠道传染方式可能也起一定的作用。但对于粪便中是否存在 HBV 却鲜有报道。该研究采用试剂盒法,提取粪便中总 DNA,使用荧光定量 PCR(FQ-PCR)法等相关技术检测 50 例乙肝患者粪便中乙肝病毒 DNA(hepatitis B Virus-DNA, HBV-DNA),旨在了解乙肝患者粪便中 HBV 的确切情况及传染性如何,并对其与乙肝病毒标志物(hepatitis B Virus marker, HBVM)之间的关系及临床意义作进一步探讨。

1 材料与方法

1.1 病例资料 50 例慢性乙型肝炎未并发消化道出血病患,均为我院感染科住院患者。诊断符合 2011 年版中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学分会联合修订的《慢性乙型肝炎防治指南》诊断标准。其中男 38 例,女 12 例,男女比例 3.2 : 1.0。年龄 33 ~ 79 (53.46 ± 11.43) 岁。同期随

The correlation study of relativity between macrosomia of gestational diabetic pregnancy and IGF-1R, IGFBP-1

Xie Weijiao¹, Wang Min², Yu Li², et al

(¹ The 306 Hospital of Anhui Medical University, Beijing 100101; ² Gynaecology and Obstetrics, The 306th Hospital of Chinese People's Liberation Army, Beijing 100101)

Abstract The mRNA of insulin-like growth factor 1 receptor (IGF-1R) and IGF binding protein-1 (IGFBP-1) in the placenta of 22 macrosomia of gestational diabetic (macrosomica group) and 18 normal birth weight infant (control group) were measured by Real Time PCR, explored the relationship between macrosomia of gestational diabetic and the levels of IGF-1R and IGFBP-1. The level of IGF-1R in the placenta of macrosomia group was significantly higher than that of control group; the expression level of IGFBP-1 in the placenta of macrosomia group was lower than that of control group, and had significant difference between the two groups.

Key words gestational diabete mellitus; macrosomia; placenta; insulin-like growth factor 1 receptor; IGF binding protein-1

机选择无乙肝肝炎病史(血清 HBVM 均为阴性)对照组 11 例,男 8 例,女 3 例,男女比例 2.7:1.0。年龄 24~69(52.86±10.34)岁。实验组与对照组的一般情况差异无统计学意义。

1.2 标本采集 清晨采集粪便隐血实验阴性,且未被尿液污染的尾便于无菌容器中。将粪便搅匀后,用分析天平(上海名桥精密科学仪器公司)称取 400 mg,每管 200 mg 分装保存于 -80 °C 待测^[2]。另抽取每位患者空腹静脉血 2 ml,分离血清后,-20 °C 冷冻保存待测。

1.3 试剂与仪器 HBsAg 诊断(ELISA 法)试剂盒购自上海科华生物有限公司;QIAmp DNA Stool kit 试剂盒购自德国 Qiagen 公司;HBV 核酸测定(荧光 PCR 法)试剂盒购自上海之江生物科技股份有限公司;分析天平购自上海名桥精密科学仪器公司;Mx3000p 荧光定量 PCR 仪购自美国 Stratagene 公司;凝胶成像仪购自德国 Eppendorf 公司。

1.4 方法

1.4.1 血清 HBVM 检测 采用 ELISA 法检测 HBeAg、HBsAb、HBeAg、HBeAb、HBcAb,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。

1.4.2 粪便中 HBsAg 检测 在 200 mg 粪便中加入 4 ml PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)缓冲液,充分震荡 5 min,4 000 r/min 离心 15 min,取上清液。剩余步骤根据 HBsAg 诊断(ELISA 法)试剂盒说明书进行。

1.4.3 粪便总 DNA 的抽提 使用 QIAmp DNA Stool kit 试剂盒法抽提粪便总 DNA。将 200 mg 粪便与 ASL 混匀,置于 95 °C 孵育 5 min,加入 Inhibit EX Tablet,室温静置后加入蛋白酶 K 和 AL 缓冲液。用乙醇沉淀 DNA 过柱洗脱后溶解于 70 μl AE 中。具体抽提程序按照试剂盒说明书要求。

1.4.4 巢式 PCR 定性检测粪便中 HBV-DNA 采用特异性 HBV 内外引物进行扩增,引物序列^[3]见表 1,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。以提取的粪便总 DNA 为模板,扩增采用 25 μl 反应体系。第一轮反应:10×PCR Buffer 2.5 μl, dNTP mix 2 μl, Taq 酶 0.2 μl, DNA 模板 1 μl, 外引物上下游各 1 μl, 2.5 μl PCR 抑制物清除剂,加无菌去离子水至 25 μl。反应条件为:94 °C 1 min, 48 °C 45 s, 72 °C 45 s。第二轮反应:以内引物扩增,取第一轮 PCR 产物 1 μl 为模板,其他体系同第一轮。反应条件为:94 °C 1 min, 55 °C 45 s, 72 °C 30 s。取第二轮 PCR 产物进行 0.5% 琼脂糖凝胶电泳,于凝胶成像系统中分析扩增结果。

表 1 HBV 巢式 PCR 扩增引物

引物	名称	序列(5'-3')	产物大小 退火温度	
			(bp)	(°C)
外引物	BO1F	TCTGCCTAATCATCTCATG	530	48
	BO1R	GCCTCGTCGTCTAACAA		
内引物	BH1F	GTGCCTTGGGTGGCTTTGG	193	55
	BH1R	TTGCCTGACTGCTGTATGGTG		

1.4.5 PCR 产物的测序与分析 第二轮 PCR 阳性产物送宝生物工程(大连)有限公司进行测序。测序结果与 GenBank 数据库中的 HBV 全基因组序列进行比对。

1.4.6 HBV-DNA 定量检测 采用 FQ-PCR 法。试剂盒使用 HBV 核酸测定(荧光 PCR 法)试剂盒,检测仪器为美国 Mx3000p 荧光定量 PCR 仪并使用其配套 Mxpro 软件分析数据。检测血清及粪便中 HBV-DNA 含量(粪便模板为抽提的粪便总 DNA),操作严格按试剂盒和仪器说明书进行。血清和粪便 HBV-DNA 的定量单位为 copies/ml(粪便中 HBV-DNA 含量以检测出的拷贝数乘以 3.5×10^{-4} 换算成 copies/mg),检测灵敏度为 1×10^3 copies/ml,检测结果大于 1×10^3 copies/ml 者为阳性结果。

1.5 统计学处理 采用 SPSS 16.0 软件进行分析,定量检测所得的粪便、血清 HBV-DNA 拷贝数以对数值表示。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,运用配对资料相关分析法、方差分析进行数据分析。

2 结果

2.1 血清 HBVM 检测结果及分组^[4] 根据 50 例患者血清 HBVM 阳性的不同组合分为 3 组。1 组:HBsAg(+), HBeAg(+), HBcAb(+), 共 21 例;2 组:HBsAg(+), HBeAb(+), HBcAb(+), 共 25 例;3 组:HBsAb(+), HBeAb(+), HBcAb(+), 共 4 例。

2.2 粪便中 HBsAg 与血清 HBVM 的关系 粪便与血清中 HBsAg 检出率不完全相同,粪便 HBsAg 阳性 37 例中有 1 例血清阴性,血清 HBsAg 阳性 46 例中有 36 例粪便阳性。粪便 HBsAg 与血清 HBsAg 之间差异有统计学意义($\chi^2 = 4.01, P = 0.045$)。

2.3 巢式 PCR 扩增结果及特异性 本研究采用相同的巢式 PCR 反应条件,分别以对照组和实验组提取物为模板进行扩增。结果显示在实验组的 50 例样本中扩增出 28 例约 193 bp 的条带,11 例对照组均未能扩增出目的条带,见图 1。将 PCR 产物的测序结果与 GenBank 数据库中 HBV 基因组序列进

行比对,序列一致。

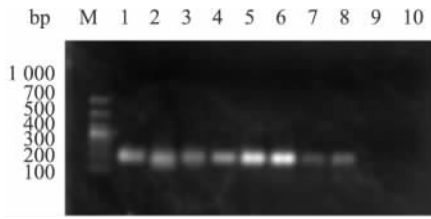


图1 HBV 巢式 PCR 扩增产物电泳图

M: DNA Marker(DLI1000);1~8:乙肝患者粪便 HBV-DNA 阳性标本;9:正常者粪便 HBV-DNA 标本;10:空白对照

2.4 血清及粪便中 HBV-DNA 定量检测 血清及粪便中 HBV-DNA 定量检测 HBV-DNA 拷贝数以对数值表示,50 例血清和粪便 HBV-DNA 含量分别为 4.35 ± 1.49 、 4.50 ± 1.59 。以大于 1×10^3 copies/ml 者为阳性判断,血清 HBV-DNA 检测,共 30 例阳性(60%),粪便中 HBV-DNA 共检测出 31 例阳性(62%)。血清中 HBV-DNA 最高含量为 4.17×10^7 copies/ml,粪便中最高含量为 2.245×10^8 copies/ml (7.875×10^4 copies/mg),见图 2。相关性分析显示,血清对粪便在 HBV-DNA 上具有相关性($P = 0.000, r = 0.860$),粪便对血清在 HBV-DNA 含量上具有相关性($P = 0.000, r = 0.860$),显示两者呈显著正相关性。

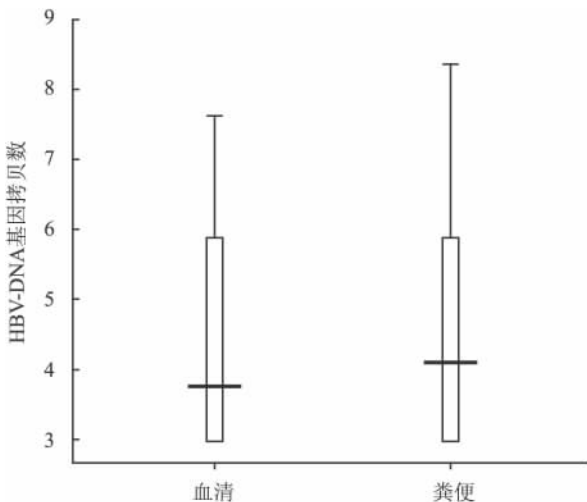


图2 血清与粪便中 HBV-DNA 含量情况

2.5 不同感染模式粪便中 HBV-DNA 检出情况比较 3 组不同感染模式中粪便 HBV-DNA 检出阳性率及含量见表 2 2 组 HBV-DNA 阳性检出率与 1 组比较差异有统计学意义($F = 5.371, P = 0.02$) 3 组与 1 组比较差异无统计学意义($F = 3.216, P = 0.251$)。粪便中 HBV-DNA 含量在不同感染模式组

合之间差异无统计学意义($F = 2.341, P = 0.069$)。

表 2 不同感染模式粪便 HBV-DNA 检出阳性率及含量

组别	总例数	阳性	阳性率	平均值
1	21	17	80.9%	5.86 ± 1.20
2	25	12	48.0%*	5.06 ± 1.22
3	4	2	50.0%	5.55 ± 3.10

平均值以对数值表示 HBV-DNA 拷贝数;与 1 组比较:* $P < 0.05$

3 讨论

HBV 感染呈世界性分布,我国以约 1.2 亿乙肝携带者,9.75% 的 HBV 平均携带率,较高的 HBV 感染率成为乙肝的高流行区^[5]。

在乙肝携带者及乙肝患者构成的传染源中,唾液、精液、阴道分泌物、乳汁、尿液等体液均检测出过 HBV 或 HBsAg,但乙肝患者的粪便能否传播 HBV 及其在流行病学上的意义,迄今未明确,《慢性乙型肝炎防治指南》亦仅提及一般不会传染^[6]。但本研究的粪便中检测到了 HBsAg,而且粪便与血清中 HBsAg 检出率有差异,在部分血清 HBsAg 阴性者的粪便 HBsAg 呈阳性,表明粪便中的 HBVM 不受血清的影响。究其原因,可能是因为 HBsAg 既耐酸又耐碱^[7],当完整的 HBV 颗粒进入肠腔后,其表面的 HBsAg 保护其不被胃液和肠液破坏,因此在排出体外的粪便中可以检测出 HBV。本研究因所采集的粪便标本量有限,对其他两组 HBVM 并未做检测,此为实验的不足之处,有待做进一步研究。

本研究粪便中 HBV-DNA 总检出率为 62%,最高含量 2.245×10^8 copies/ml (7.875×10^4 copies/mg),表明 HBV 存在于乙肝患者的粪便中。表明粪便可能具有传染性,可以作为传播 HBV 的媒介。而且有关研究^[8]在乙肝患者的唾液和胃液中均发现了 HBsAg,表明 HBV 可能存在粪-口途径传播。

对粪便与血液之间 HBV-DNA 含量相关性分析显示,两者呈显著正相关性,间接表明粪便中的 HBV 受血清病毒的影响,可能来源于血液的肠腔释放。但有相关研究^[9-10]显示,在 HBV 感染患者的胃黏膜中存在 HBV,说明 HBV 除侵犯肝脏外,也可侵犯胃黏膜,并可在其中复制。所以,HBV 在粪便中的出现究竟是通过血流还是来自肠液或胆汁,是被动停留还是在肠上皮细胞内复制后溢出,目前尚不清楚,有待做进一步研究。

3 组患者虽然已出现 HBsAb 这一保护性抗体,但仍在两例患者粪便中检测出 HBV-DNA。这可能

与个体对 HBV 的抵抗力减弱有关^[11]。同时也有慢性乙型肝炎感染 HBsAg 水平很低、血清学法不能检测出的可能。有研究^[12]表明,使用血清样本检测 HBV-DNA 时,未及时分离血清,抗凝剂、溶血、脂血、黄疸和不同的核酸提取方法等情况会造成检测结果在数量级上的差异。低水平肝素 (< 100 μ /ml) 水平对 HBV-DNA 检测结果影响较小,但中、高水平肝素 (> 500 μ /ml) 对 HBV-DNA 检测有抑制作用,当肝素水平达 1 200 μ /ml 时,直接煮沸裂解法和 NP240 煮沸裂解法已检测不到高水平 HBV-DNA^[13]。而本研究建立的从粪便中定量检测 HBV-DNA 的方法,其 HBV-DNA 检出含量与检出率与血清中基本无差异。比较于血清,粪便在保存和抗外界影响因素方面更加方便、稳定,提示可以用粪便作为检测 HBV-DNA 的又一本来来源。而且,采集粪便属于无创操作,减少了乙肝患者再次感染和医护人员被感染的风险。

参考文献

- [1] Shimoda T, Shikata T, Karasawa T, et al. Light microscopic localization of hepatitis B virus antigens in the human pancreas [J]. *Gastroenterology*, 1981, 81(6): 998-1005.
- [2] Matsuda T, Watanabe K, Fujimoto J, et al. Quantitative PCR with 16S rRNA-gene-targeted species-specific primers for analysis of human intestinal bitidobacteria [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2004, 70(1): 167-73.
- [3] 张杰, 张玲, 宋曼. 血痕中乙型肝炎病毒 DNA 检测[J].

- 中国公共卫生, 2010, 26(8): 983-5.
- [4] 蔡军, 胡宏, 刘晓丽. 定量检测乙型肝炎病毒 HBeAg 与 HBV-DNA 的临床意义[J]. *中华使用诊断与治疗杂志*, 2009, 23(9): 893-4.
- [5] 庄辉. 乙型肝炎流行病学进展[J]. *中国医学前沿杂志*, 2009, 1(2): 18-25.
- [6] 中华医学会肝病学会、中华医学会感染病学会联合修订. 慢性乙型肝炎防治指南[J]. *肝脏*, 2011, 16(1): 2-16.
- [7] Noppornpanth S, Sathirapongsasuti N, Chongsrisawat V, et al. Detection of HBsAg and HBV-DNA in serum and saliva of HBV carrier[J]. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 2000, 31(2): 419-22.
- [8] Hussain A B, Karamat K A, Anwar M, et al. Correlation of HBV-DNA PCR and HBeAg in hepatitis B carriers[J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2004, 14(1): 18-20.
- [9] 刘伟, 赵伟, 罗婵, 等. 乙型肝炎患者胃黏膜中 HBeAg 和 HBV-DNA 表达分析[J]. *临床内科杂志*, 2003, 20(2): 88-9.
- [10] van der Eijk A A, Niester H G, Götz H M, et al. Paired measurements of quantitative hepatitis B virus DNA in saliva and serum of chronic hepatitis B patients: implications for saliva as infection agent [J]. *J Clin Virol*, 2004, 29(2): 92-4.
- [11] Peng X M, Gu L, Chen X J. Optimization of competitively differentiated polymerase chain reaction in detection of HBV basalcore promoter mutation[J]. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(23): 3614-8.
- [12] 尹琦, 徐玉婵. 影响 HBV-DNA 测定的标本因素[J]. *临床检验杂志*, 2008, 26(2): 133-4.
- [13] 陈晓东, 陶志华, 周武. 核酸提取方法在聚合酶链反应测定乙肝病毒核酸中的评价[J]. *中华医学检验杂志*, 2002, 25(4): 212-4.

Study on relationship among hepatitis B virus markers and content of HBV-DNA in feces of patients with hepatitis B virus infection

Zhou Xiangtian^{1,2}, Lv Ru^{1,2}, Zheng Jishun³, et al

(¹Dept of Infectious Diseases, The First Affiliated Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230022; ²Anhui Center for Surveillance of Bacterial Resistance, Hefei 230022; ³The First People's Hospital of Hefei, Hefei 230012)

Abstract We collected the samples of feces and serum for all patients. HBVM in serum and feces were determined with ELISA. Using QIAmp DNA Stool kit to extract human fecal DNA. FQ-PCR were utilized for analysis the content of HBV-DNA in feces and serum while it was detected qualitatively by nested-PCR. Depending on the combination of HBVM, 50 patients were divided into three groups. Hepatitis B surface antigen was positive in 37 cases of stool and 46 cases of serum, both the detection rates were significant ($P < 0.05$). FQ-PCR quantitative detection of HBV-DNA in serum and fecal contents were 4.35 ± 1.49 and 4.50 ± 1.59 . The positive rates of HBsAg were 74%, 92% in feces and serum, respectively. HBsAg was found in feces in one patient without HBsAg in serum. In 50 patients, the positive rates of HBV-DNA were 62%, 60% in feces and serum, respectively.

Key words HBV-DNA; hepatitis B virus markers; feces; FQ-PCR; nested PCR