

参考文献

[1] 邱玲,程歆琦,刘茜,等. 自动生化分析仪携带污染源检出及处理[J]. 医学研究杂志, 2007, 36(6): 64-67.

[2] 罗梅. 全自动生化分析仪交叉污染的分析及排除[J]. 中国误诊学杂志, 2009, 9(4): 792-793.

[2] 顾光煜,张葵. 临床化学自动分析的携带污染与解除[J]. 临床检验杂志, 2007, 25(6): 401-403.

[3] 刘津. 试剂间交叉污染干扰无机磷测定的探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(3): 286-288.

[4] 沈振亚,李智,左枚军. Modular-PPI 全自动生化分析仪试剂携带污染及其解决措施[J]. 临床检验杂志, 2008, 26(3): 219-220.

[5] 林海川,梅玉峰. 全自动生化分析仪常用试剂间的相互干扰和应对措施[J]. 医学信息杂志, 2010, 12(9): 3815-3816.

[6] 于雷. 生化自动分析仪项目间试剂的交叉污染及其避免方法[J]. 临床检验杂志, 2003, 21(3): 168.

[7] 顾国宝,陈洁,李燕,等. 全自动生化仪使用中项目间交叉污染的探讨[J]. 上海医学检验杂志, 2002, 17(3): 176-177.

[8] 白俊玺,舒仁民,王家泗,等. C 反应蛋白与三酰甘油联合测定在监测全自动生化分析仪清洗功能中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2009, 30(12): 1223-1224.

(收稿日期:2011-04-10)

• 经验交流 •

乳汁前处理对乙型肝炎病毒 DNA 检测结果的影响

李国玉,陈 勇,陈金弟,李静梅
(福建省南平市九二医院检验科 353000)

摘 要:目的 使用新的乳汁前处理方法对乳汁中的 HBV DNA 含量进行检测,提高乳汁中 HBV DNA 的检出率,以期评价该方法的准确性及有效性。方法 应用 Microcon YM 100 超滤柱法与传统的提取方法提取乳汁中的 DNA,通过实时荧光定量法检测 HBV DNA,比较两种方法对乳汁中 HBV DNA 的检出率。结果 在 50 例乳汁样本中,使用超滤柱法检出 HBV DNA 阳性的样本共 40 例,阳性率达到 80%,而使用传统方法共检出 30 例,阳性率只有 60%;比较两种方法检出 HBV DNA 的拷贝数, $P<0.05$,差异有统计学意义。结论 使用超滤柱法提取乳汁中的 HBV DNA 能提高乳汁中的 HBV 检出率,对于指导临床科学的母乳喂养提供可靠的实验室依据。

关键词:肝炎病毒,乙型; DNA; 乳汁

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.040 文献标识码:B 文章编号:1673-4130(2011)07-0802-02

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)母婴传播的研究已受到医学界的关注,HBV 的垂直传播是多因素、多环节、多变异的复杂过程,而母乳喂养是引起 HBV 感染的重要因素。产妇乳汁 HBV DNA 定量检测有助于临床医生正确指导孕妇的喂养方式,产妇乳汁 HBV DNA 的检测虽有报道,但是其检测方法及检出率差异甚大,缺乏乳汁前处理方法的深入研究^[1]。本组拟用改良后乳汁前处理方法与传统的提取方法进行比较,分析乳汁中 HBV 的病毒载量,探讨乙型肝炎产妇乳汁的安全性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 分娩 24 h 内的初乳采自 2009 年 1 月 1 日至 12 月 31 日在本院产科病房分娩的产妇,其血清 HBsAg 阳性,血清中 HBV DNA 拷贝数大于 1.0×10^3 copy/mL,谷草转氨酶及谷丙转氨酶均小于 40 U/L,共 50 例,平均年龄(23.2±5.2)岁,平均孕龄(38.1±1.2)周。用温水清洗乳头,然后轻轻挤出初乳约 3 mL,置于无菌塑料管中,−20 ℃保存。同时抽取静脉血 3 mL,2 500 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,取上清液保存于−20 ℃。

1.2 方法

1.2.1 传统的乳汁 HBV DNA 前处理方法 取产妇乳汁 3 mL,2 500 r/min,离心 10 min,离心半径 8 cm,小心吸取出中层乳清液,然后再次 2 500 r/min 离心 10 min,离心半径 8 cm,将第 2 次离心后所得中层乳清置于−20 ℃待检。

1.2.2 改良的乳汁 HBV DNA 前处理方法 500 μL 乳汁,加入 NET(50 mmol/L NaCl,125 mmol/L EDTA,50 mmol/Tris-

HCl,pH 为 7.6)缓冲液 100 μL,70 ℃水浴 15 min,加入 RNase 3 μL,蛋白酶 K 10 μL,56 ℃ 30 min,20 000 g 离心 10 min,取水相 200 μL 加入 Microcon YM 100 纯化柱,500 g 离心 15 min,反转纯化柱,1 000 g 离心 5 min,将纯化浓缩后的样本置于−20 ℃待检。以上两种方法所提取的乳汁 DNA 样本与血清样本均按深圳匹基生物公司提供的 HBV DNA 荧光定量检测试剂盒的操作步骤进行 HBV DNA 拷贝数检测,试剂盒的检出限度为 2.0×10^2 copy/mL。

2 结 果

两种方法都检出 29 例乳汁样本,用 SPSS 13.0 软件包对 HBV 拷贝数结果进行统计学处理,经分析,差异有统计学意义($F=4.96, P<0.05$)。

3 讨 论

中国是乙型肝炎高发区,人群 HBV 总感染率为 45%~60%,其中近半数由母婴传播引起,因此产妇乳汁排毒率引起各界重视^[2]。由于母乳中含有多种营养成份和抗病毒物质,在发展中国家母乳喂养的婴儿常见疾病发病率和严重程度明显低于人工喂养儿。因此世界卫生组织(WHO)提出所有婴儿(母亲 HIV 感染时除外)都应该母乳喂养,包括对慢性 HBV 携带的母亲^[3]。中国 HBV 携带产妇占正常产妇的 25%左右,母乳喂养的安全性值得重视。应用荧光定量 PCR 技术对产妇血清、乳汁进行 HBV DNA 载量检测。在中国约占婴幼儿感染的 1/3^[4],乙型肝炎产妇母乳喂养是乙型肝炎通过母婴传播的重要途径之一^[4]。关于 HBV 携带产妇能否进行母乳喂养,国际上一直存在争议,在实施乙型肝炎疫苗接种前,Beasley

等^[5]曾观察到喂养方式与婴儿 HBV 感染无关,认为母乳喂养在婴儿出生后感染 HBV 中不起重要作用;也有报道,人类肠黏膜中存在 HBsAg 的抑制物,能使进入十二指肠的 HBsAg 失去活性,因此研究者认为乳汁中单纯 HBsAg 阳性的产妇可以哺乳^[6]。而 HBsAg 并非 HBV 复制的标志,HBV DNA 作为 HBV 的基因组成和复制模板,是病毒复制最直接和可靠的标志,母乳中检测出 HBV DNA 才具有最可靠的感染性指标,虽然乳汁中 HBV DNA 含量较低,但婴儿每日进食量较多,且进食时间较长,一旦婴儿消化道黏膜因炎症发生水肿或黏膜破损,母乳中的 HBV 仍然可能通过毛细血管进入血循环而引起感染。对于慢性乙型肝炎携带者的孕妇,适当的应用 HBV 免疫球蛋白进行免疫预防,不会增加 HBV 感染的风险^[7]。

PCR 技术是一种分子水平的病原学检测方法,能确定标本是否存在病毒颗粒,是目前用于乳汁筛选较为理想的检测手段。在乳汁 HBV 核酸提取中,加入 SDS 作为变性剂提取 DNA,容易得到阳性结果。另外加入 RNase 及蛋白酶 K,会使荧光定量的扩增曲线的强度及重复性大大提高,从而提高了检测的稳定性与灵敏度。超滤是浓缩样品的更好选择。超滤是一种膜分离技术,它的特点是使用不对称多孔膜,根据分子的大小来分离溶液中的大分子物质与小分子物质,是一种温和的、非变性的物理分离方法,尤其适用于蛋白质等大分子溶液的浓缩、纯化以及缓冲体系交换等。超滤操作最简单的工具为离心超滤管,其通过离心力,使溶液中的小分子溶液和溶剂透过超滤膜,被收集在滤过液收集瓶中,而大分子溶质则被超滤膜截流在样品浓缩管中。该方法的特点是操作简便,只需要高速离心机,无需其他特殊设备,速度快,可以有效浓缩样本,而且可以部分去除样本溶液中的盐、去垢剂等可溶性小分子,有利于更换缓冲体系^[8]。在本研究中使用美国密理博公司生产的 Microcon YM 100 超滤离心管,其最大的滤过蛋白的相对分子质量为 10×10^3 ,能过滤掉提取体系中的全部蛋白与离子盐等杂质,比起常用的酚/氯仿抽提 DNA 的经典方法,减少了

这些提取溶剂对下一步 PCR 反应体系的抑制作用^[9]。并且超滤离心管能将溶液体积从 $500 \mu\text{L}$ 浓缩至 $5 \sim 15 \mu\text{L}$ 的 DNA 样本,这样大大提高了核酸物质的检出效率,因此在本研究中使用超滤离心管不仅去除了体系中大部分的杂质,提高 DNA 的纯度,而且对 DNA 的浓度进行了浓缩,从而使乳汁中 HBV DNA 的检出率大大地提高,减少了漏诊率。

参考文献

- [1] 李甲芬,秦跃花,张良,等. HBV 标志物阳性者产妇乳汁 HBV DNA 测定[J]. 临床检验杂志,2005,23(2):119.
- [2] 王晓东,张立梅,李凤焕,等. 感染 HBV 产妇乳汁乙型肝炎病毒标志物检测的意义[J]. 国际检验医学杂志,2009,30(9):907-908.
- [3] 马力,赵桂珍,梁争论. 孕妇血清乳汁 HBV DNA 载量与母乳喂养安全性的研究[J]. 中国现代医学杂志,2006,16(17):2851-2855.
- [4] 乐杰. 妇产科学[M]. 6 版. 北京:人民卫生出版社,2004:154.
- [5] Beasley RP, Stevens CE, Shiao IS, et al. Evidence against breast feeding as a mechanism for vertical transmission of hepatitis B [J]. Lancet, 1975, 2(7938):740-741.
- [6] Klaus PM, 著. 郝连杰,译. 肝炎及其后果:急性与慢性肝病的诊断、治疗和预防[M]. 5 版. 北京:人民卫生出版社,2001:97.
- [7] Hill JB, Sheffield JS, Kim MJ, et al. Risk of hepatitis B transmission in breast-fed infants of chronic hepatitis B carriers[J]. Obstet Gynecol, 2002, 99(6):1049-1052.
- [8] Schiffner LA, Bajda EJ, Prinz M, et al. Optimization of a simple, automatable extraction method to recover sufficient DNA from low copy number DNA samples for generation of short tandem repeat profiles[J]. Croat Med J, 2005, 46(4):578-586.
- [9] Greening DW, Simpson RJ. A centrifugal ultrafiltration strategy for isolating the low-molecular weight ($\leq 25\text{K}$) component of human plasma proteome[J]. J Proteomics, 2010, 73(3):637-648.

(收稿日期:2011-03-26)

• 经验交流 •

基层医院金黄色葡萄球菌的耐药现状与分析

吕卫东¹, 张平安^{2△}

(1. 湖北省蕲春县第三人民医院检验科 435300; 2. 武汉大学人民医院检验科 430060)

摘要:目的 了解金黄色葡萄球菌(SA)的分离率及耐药现状,为临床提供诊疗依据。方法 采用 K-B 纸片法进行药敏试验,采用头孢西林纸片法进行耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)鉴定。结果 本组 233 株 SA 在呼吸道标本检出率最高,在脓液中第 2。MRSA 对抗菌药物的耐药率明显高于甲氧西林敏感金黄色葡萄球菌(MSSA)。结论 应加强对患者医院感染好发部位的监测与护理,即使在二级医院的临床微生物室也务必常规开展 MRSA 的检测工作。

关键词: 葡萄球菌,金黄色; 交叉感染; 抗药性

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.041

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2011)07-0803-02

金黄色葡萄球菌(staphylococcus aureus, SA)是医院感染的重要病原菌之一,可致多种感染性疾病,严重时可危及生命^[1-2]。尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(meticillin-resistant Staphylococcus aureus, MRSA)出现以来,其多重耐药性和交叉耐药性加大了临床的治疗难度,已受到广泛的关注^[3-6]。

为了解 SA 的分离率及耐药现状,为临床提供诊疗依据,对临床标本中分离的 233 株 SA 进行调查分析,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2009 年 1 月至 2010 年 6 月期间,从湖北省蕲春县经三人民医院患者送检的各类临床标本(痰液、尿液、血

△ 通讯作者, E-mail: zhangpingan@yahoo. com. cn.