

· 临床论著 ·

慢性 HBV 感染产妇血清、初乳和成熟乳中 HBV DNA 含量分析及临床意义

汪雪玲 易为 李春梅 王士俊 刘雪净 刘建云 刘亚楠 万钢

【摘要】目的 检测慢性乙型肝炎病毒 (HBV) 感染产妇的血清、初乳和成熟乳中 HBV DNA 含量, 为指导慢性 HBV 感染产妇母乳喂养提供实验证据。 **方法** 应用荧光定量聚合酶链反应技术对 211 例 HBV 感染产妇的血清和乳汁进行检测, 按血清 HBV DNA 含量分为 HBV DNA 阴性组 ($< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml)、低病毒含量组 ($500 \sim 9.99 \times 10^5$ 拷贝/ml) 和高病毒含量组 ($\geq 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml) 共 3 组, 采集产妇初乳和成熟乳, 分析比较产妇血清、初乳以及成熟乳中病毒 HBV DNA 含量。 **结果** 血清 HBV DNA 阴性组患者 71 例, 其对应初乳和成熟乳 HBV DNA 均为阴性。血清低病毒含量组患者 75 例, 其对应初乳和成熟乳 HBV DNA 的阳性率分别为 4% 和 0%, 血清与初乳相比差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 112.55, P < 0.001$), 初乳与成熟乳相比差异无统计学意义 ($P = 0.24$)。血清高病毒含量组患者 65 例, 其对应初乳和成熟乳 HBV DNA 的阳性率分别为 75.4% 和 15.4%, 血清与初乳、初乳与成熟乳相比差异均具有统计学意义 ($\chi^2 = 16.99, P < 0.001$; $\chi^2 = 47.2, P < 0.001$)。当血清 HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ 拷贝/ml 时, 成熟乳 HBV DNA 75.7% 为阴性, 24.3% 阳性患者 HBV DNA 含量为低水平 ($< 10^4$ 拷贝/ml)。初乳与血清、成熟乳与初乳 HBV DNA 含量水平呈正相关关系 ($r = 0.70, P < 0.001$; $r = 0.29, P < 0.001$)。 **结论** 随着血清 HBV DNA 含量的增高, 对应初乳和成熟乳中 HBV DNA 的含量亦有增高趋势, 但三者之间差异具有统计学意义, 初乳中 HBV DNA 低于血清, 成熟乳中 HBV DNA 低于初乳, 提示 HBV 通过乳汁发生母婴传播的风险较小。

【关键词】 肝炎病毒, 乙型; HBV DNA 含量; 血清; 乳汁; 母乳喂养; 实时荧光定量聚合酶链反应

Analysis on HBV DNA copies in the serum, colostrum and mature milk of women with chronic infection of hepatitis B virus WANG Xueling, YI Wei, LI Chunmei, WANG Shijun, LIU Xuejing, LIU Jianyun, LIU Yanan, WAN Gang. Department of Obstetrics, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: WANG Xueling, Email: 1191692896@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the evidence of guiding the breast feeding for women infected by chronic hepatitis B virus (HBV) by detection the load of HBV DNA in the serum, colostrum, and mature milk. **Methods** Total of 211 women with infection of HBV were classified into the three groups: the negative group ($< 5 \times 10^2$ copies/ml), the minor group ($500 \sim 9.99 \times 10^5$ copies/ml) and the major group ($\geq 1.0 \times 10^6$ copies/ml) according to the copies of HBV DNA in serum. The HBV DNA copies in the serum, colostrum and mature milk from the three groups of women were detected by fluorescence quantitative PCR technique, respectively. And the statistical analysis of the load of HBV DNA were performed between in serum, colostrum and mature milk from the three groups. **Results** The negative group was 71 cases, the corresponding colostrum and mature milk was negative expression of HBV DNA. The minor group was 75 cases, the positive rates in the corresponding colostrum and mature milk was separately 4% and 0%, respectively. There was statistically significant differences between serum and colostrum ($\chi^2 = 112.55, P < 0.001$). However, the positive rate in colostrum was compared with the mature milk without statistical

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.03.028

基金项目: 首都医科大学附属北京地坛医院科研基金资助项目 (No. YN2011-01)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院产科 (汪雪玲、易为、王士俊、刘雪净、刘建云), 护理部 (李春梅), 检验科 (刘亚楠), 病案室 (万钢)

通讯作者: 汪雪玲, Email: 1191692896@qq.com

significance ($P = 0.24$). There were 65 cases in the major group, and the positive rate in the corresponding colostrum and mature milk was separately 75.4% and 15.4%, respectively. The differences between in the serum and the colostrum or between in the colostrum and the mature milk were both with statistical significance ($\chi^2 = 16.99$, $P < 0.001$; $\chi^2 = 47.2$, $P < 0.001$). When the load of HBV DNA of serum were more than 1.0×10^7 copies/ml, the positive rate of HBV DNA in the mature milk was 24.3% and the load of HBV DNA was low ($< 10^4$ copies/ml). The colostrum and the serum or the mature milk and the colostrum were both the positive correlation ($r = 0.70$, $P < 0.001$; $r = 0.29$, $P < 0.001$). **Conclusions** HBV DNA copies in the corresponding colostrum and mature milk were both increased when load of HBV DNA in the serum was increased. The load of HBV DNA in the colostrum was fewer than that in serum and load of HBV DNA in mature milk was fewer than that in colostrum. The results supplied the experimental evidence that the risk of HBV infection by the breast milk was relative tiny.

【Key words】 Hepatitis B virus; HBV DNA copies; Serum; Breast milk; Breast feeding; Fluorescent quantitative polymerase chain reaction

母婴传播是乙型肝炎病毒 (hepatitis B virus, HBV) 传播的主要途径, 是造成 HBV 慢性感染的重要原因^[1]. HBV 通过母乳传播的风险尚缺乏有效的论证, 慢性 HBV 感染母亲能否进行母乳喂养仍存在争议。本研究旨在通过检测慢性 HBV 感染产妇血清、乳汁中的 HBV DNA 含量为指导慢性 HBV 感染产妇母乳喂养提供一定的实验依据, 报道如下。

资料与方法

一、研究对象及分组

选取2010年12月至2012年7月在首都医科大学附属北京地坛医院足月分娩的慢性HBV感染产妇共211例, 入组患者孕期血清ALT、AST正常或增高不超过正常值3倍, 孕期服用抗病毒药者排除。全部患者符合2000年《病毒性肝炎防治方案》诊断标准。采集产妇分娩期间的血标本, 检测HBV血清标志物 (HBV markers, HBVM) 和HBV DNA, 检测初乳 (产后2~5 d) 及成熟乳 (产后1个月) HBV DNA。根据产妇血清HBV DNA含量值分为3组: ①阴性组 (71例): HBV DNA $< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml; ②低病毒含量组 (75例): HBV DNA $500 \sim 9.99 \times 10^5$ 拷贝/ml; ③高病毒含量组 (65例): HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml。

三、标本的采集和处理

无菌采集每例入组孕妇静脉血 3 ml 送检, 初乳: 产后 2~5 d 清洁双乳后, 留取乳汁 2~4 ml 于无菌试管送检, 成熟乳: 产后 1 个月时采集乳汁 2~4 ml 送检。

处理: ①将送检血清置于室温自然凝固或 4 000 r/min, 离心 5min, 吸取上层血清备用; 乳汁

离心后, 弃上层脂肪, 取中层乳清备用, ②取 100 μ l 待检样本, 加入 100 μ l 核酸提取液 A, 振荡混匀 10 s, 13 000 r/min 离心 10 min, ③弃上清, 加入 50 μ l 核酸提取液 B 至沉淀中, 振荡混匀 10 s, 100 $^{\circ}$ C 保温 10 min, ④ 13 000 r/min 离心 3 min 取出上清液 7 μ l 加入配置好的反应管中, 低速离心数秒, 取出置定量 PCR 仪上进行扩增, 其他按说明书操作。

四、检测试剂和仪器设备

应用上海复星长征医学科学有限公司生产的 FQ-PCR 诊断 HBV DNA 试剂盒, 试剂灵敏度为 5.0×10^2 拷贝/ml, HBV DNA 定量检测线性范围 $5.0 \times 10^2 \sim 9.99 \times 10^8$ 拷贝/ml。孕妇 HBV M 检测采用微粒化学发光法检测外周血中 HBsAg、抗-HBs、HBeAg、抗-HBe 和抗-HBc, 试剂盒为美国雅培公司生产, 均按照说明书操作和判断结果。仪器设备: HBV DNA 检测使用罗氏 LightCycler 480 PCR; HBVM 采用 I2000 免疫发光分析仪。

五、实验阴性和阳性的判断标准

阴性标准: HBV DNA $< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml; 阳性标准: HBV DNA $\geq 5 \times 10^2$ 拷贝/ml, 直接报告定量结果。

七、统计学处理

采用 EpiData 3.2 软件建立数据库, 运用 SAS 9.1 进行统计分析, 计数资料采用频数和率进行统计描述, 组间比较采用 χ^2 检验, 相关性分析采用 Pearson 相关分析; $P < 0.05$ 判断差异具有统计学意义。

结 果

一、HBV 感染产妇的血清、初乳、成熟乳 HBV DNA 阳性率在同组之间比较

1. 阴性组患者共 71 例产妇 (占 33.6%), 其

对应初乳和成熟乳 HBV DNA 均为阴性。

2. 低病毒含量组患者75例产妇(占35.5%), 其对应初乳和成熟乳阳性率分别为4% (3/75) 和 0%, 血清与初乳比较差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 112.55, P < 0.001$), 初乳与成熟乳比较差异无统计学意义 ($P = 0.24$); 血清和初乳阳性的HBV DNA含量水平(拷贝/ml的对数)为 (3.87 ± 0.98) 和 (2.41 ± 0.13)。

3. 高病毒含量组共 65例产妇(占30.8%), HBeAg均为阳性, 其对应初乳和成熟乳阳性率为75.4% (49/65) 和 15.4% (10/65); 血清与初乳、初乳与成熟乳比较差异均具有统计学意义 ($\chi^2 = 16.99, P < 0.001$; $\chi^2 = 47.2, P < 0.001$); 血清、初乳和成熟乳阳性的HBV DNA含量水平为 (7.04 ± 0.52)、(3.35 ± 0.74) 和 (3.18 ± 0.39)。

4. 初乳与血清、成熟乳与初乳HBV DNA含量水平呈正相关关系 ($r = 0.70, P < 0.001$; $r = 0.29, P < 0.001$), 见表1。

二、初乳、成熟乳 HBV DNA 阳性率在各组之间的比较

1. 初乳: 阴性组和低病毒组相比差异无统计学意义 ($P = 0.24$), 低病毒组和高病毒组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

2. 成熟乳: 阴性组与低病毒组相比差异无统计学意义 ($P = 0.97$), 低病毒组与高病毒组相比差异具有统计学意义 ($P < 0.001$)。

3. 按血清HBV DNA含量将高病毒组再分HBV DNA 10^6 拷贝/ml与 10^{7-8} 拷贝/ml两组, 初乳HBV DNA阳性率分别为64.3% (18/28)、83.8% (31/37), 二者之间差异无统计学意义 ($P = 0.07$); 成熟乳HBV DNA阳性率为3.6% (1/28) 和24.3% (9/37), 二者差异具有统计学意义 ($P = 0.02$), 见表1。

讨 论

HBV病毒核酸基因是HBV的遗传物质基础, 是判断传染性最为客观的指标^[2], 其含量的多少直接决定传染性的大小。国内外研究提示, 母婴垂直传播与孕妇血清病毒含量明确相关, 并且母婴宫内传播以血清HBV DNA滴度 $\geq 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml作为浓度界值^[3], 因此, 本研究根据产妇血清HBV DNA含量的高低分为3组, 进行血清、初乳和成熟乳的HBV DNA比较。

初乳与血清HBV DNA含量水平呈正相关, 随着血清HBV DNA含量的增高, 初乳中的HBV DNA含量也升高, 初乳低于血清。在低病毒含量组和高病毒含量组中, 初乳与血清HBV DNA含量都存在显著性差异。当血清HBV DNA $< 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml, 初乳中HBV DNA阳性率极低; 当血清HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml, HBeAg均为阳性, 初乳中HBV DNA阳性率大幅度增加, 低病毒含量组和高病毒含量组初乳的阳性率分别为4%和75.4%, 彭其才等^[4]研究中分别为10%和87.8%, 夏伟等^[5]研究中分别为12.5/%和76.8%, 本研究结果同以上研究结果相似。当母乳中含有HBV DNA, 就有可能诱发HBV感染^[2], 理论上讲, 婴儿口腔或胃肠道任何一处发生炎性水肿通透性增加或出现破损, 母乳中的HBV DNA就可能通过黏膜进入到婴儿的血循环, 导致婴儿的感染。因此, 国内不少研究提出根据初乳检测结果作为指导慢性HBV感染产妇母乳喂养的依据^[6-7], 若乳汁检测中含有HBV DNA, 就不宜母乳喂养, 应采用人工喂养。近来有研究提出, 以血清HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml界值作为低、高危的分界线^[4-5], 并提出以此界值可以作为指导母乳喂养的依据。

产妇成熟乳(1个月)检测结果显示, 当血清HBV DNA $< 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml时, 成熟乳HBV DNA

表1 产妇血清、初乳和成熟乳不同 HBV DNA 含量情况

组 别	血 清		初乳 HBV DNA 含量				成熟乳 HBV DNA 含量			
	例数	阳性率 (%)	$< 5 \times 10^2$	$< 10^{2-3}$	$< 10^{4-5}$	阳性率 (%)	$< 5 \times 10^2$	$< 10^{2-3}$	$< 10^{4-5}$	阳性率 (%)
血清阴性组 ($< 5 \times 10^2$ 拷贝/ml)	71	0	71	0	0	0 ^①	71	0	0	0 ^②
血清低病毒含量组	75	100 ^a	72	3	0	4 ^b	75	0	0	0 ^c
500~9.99 × 10 ³ 拷贝/ml	49	65.3	49	0	0	0	49	0	0	0
10 ⁴ ~9.99 × 10 ⁵ 拷贝/ml	26	34.7	23	3	0	13.0	26	0	0	0
血清高病毒含量组	65	100 ^d	16	38	11	75.4 ^e	55	10	0	15.4 ^f
1 × 10 ⁶ ~9.99 × 10 ⁶ 拷贝/ml	28	40.1	10	16	2	64.3 ^g	27	1	0	3.6 ^h
$\geq 10^7$ 拷贝/ml	37	56.9	6	22	9	83.8 ⁱ	28	9	0	24.3 ^j

注: 低病毒含量组血清、初乳、成熟乳之间: ^a与^b比较: $P < 0.001$, ^b与^c比较: $P = 0.24$; 高病毒含量组血清、初乳、成熟乳之间: ^d与^e、^e与^f比较: P 均 < 0.001 ; 各组患者初乳之间: ^①与^b比较: $P = 0.24$, ^b与^c比较: $P < 0.001$; 3组患者成熟乳之间: ^②与^c比较: $P = 0.97$, ^c与^f比较: $P < 0.001$; 高病毒含量组二层之间: 初乳^g与ⁱ比较: $P = 0.07$, 成熟乳^h与^j比较: $P = 0.02$

阳性率为0%；当产妇血清HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^6$ 拷贝/ml时，成熟乳中的HBV DNA阳性率15.4%，与初乳相比有显著性差异。检索国内外文献，以往对乳汁的研究几乎局限于初乳，而成熟乳与初乳、血清HBV DNA的关系少见报道。张兰英等^[8]研究曾发现，18例最早初乳HBV DNA阳性者中（18/219），间隔1~30 d后仅1例患者乳汁中HBV DNA阳性，产妇产下乳24 h后母乳HBV DNA携带显著低于最早初乳。也有报道显示，血清阳性、初乳阴性，而满月乳有部分阳性^[9]。本研究结果表明，1个月成熟乳与产后2~5 d的初乳之间差异具有统计学意义。

由于受实验条件所限，HBV DNA的检测下限是 5.0×10^2 拷贝/ml，低于此下限时无法获得HBV病毒含量数值，故只能计算乳汁中HBV DNA阳性部分的病毒含量，实际乳汁中HBV DNA平均含量低于HBV DNA阳性部分平均含量，血清、乳汁HBV DNA阳性率的差异，其本质在于HBV DNA含量的差异。

本研究显示，血清HBV DNA含量增高时，其对应初乳和成熟乳中HBV DNA的含量亦有所增高，将血清低病毒组、高病毒组分为如图表中所示的二层后，从表1能直观地看到这种变化和差异，血清HBV DNA在 10^6 与 10^{7-8} 拷贝/ml，初乳HBV DNA阳性率之间差异无统计学意义，成熟乳HBV DNA阳性率二者差异具有统计学意义，提示即便血清HBV DNA $\geq 1.0 \times 10^7$ 拷贝/ml，成熟乳中75.7%患者HBV DNA为阴性，24.3%阳性中HBV DNA为低水平（ $<10^4$ 拷贝/ml），提示成熟乳的传播风险与血清相比显著降低，HBV感染产妇通过哺乳发生母婴传播的风险较小，并且由于婴儿出生后立即进行了主、被动联合免疫，婴儿出生后体内就有保护性抗体存在，婴儿通过母乳喂养发生母婴传播的风险将会更低。近年来，国内外一些研究表明，在联合免疫下母乳喂养与人工喂养婴儿感染无显著性差异^[10-14]，以雷章等^[14]研究为代表母亲血清HBsAg阳性母乳喂养和人工喂养婴儿感染的发生率分别为8.3%和9.2%，二者差异无统计学意义。由于乳汁HBV DNA随着血清的增高而增高的特性，以及与血清病毒含量的巨大差异，提示母乳喂养在

一定条件下是安全的。由于受实验样本量的限制，未能确定初乳、成熟乳中HBV DNA与产妇血清中HBV DNA的数量关系，血清、初乳、成熟乳HBV DNA含量的关系有待更大样本的研究得以证实。未来加强对慢性HBV感染产妇乳汁的研究，开展对婴儿较长时间的多中心、大样本的随访观察，从而进一步明确母乳喂养的安全的血清HBV DNA界值，具有巨大的社会和经济价值。

致谢：本研究得到首都医科大学附属北京地坛医院产科HBV感染产妇的配合帮助；还得到检验科赵辉主任、华文浩主任、宋淑静，蔡皓东大夫，妇产科许艳丽、李丽、伊诺、付丽华、杨秀琴、李桂荣等的大力支持，对此一并致以诚挚的感谢。

参考文献

- 1 邹怀宾, 陈煜, 张华, 等. 乙型肝炎病毒母婴传播及其阻断研究的现状与存在问题[J]. 中华肝病杂志, 2010, 18(7): 556-558.
- 2 Silvia S. Hepatitis B virus and pregnancy[J]. Hepatitis Annual, 2007, 4(1): 12-23.
- 3 Tram T. Management of hepatitis B in pregnancy: weighing the options[J]. Clin J Med, 2009, 76(Suppl 3): S25-S29.
- 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HBVDNA浓度的影响[J]. 中山大学学报: 医学科学版, 2010, 31(5): 729-731.
- 5 夏伟, 陈芳. 乙肝携带产妇血清、乳汁及新生儿血清中HBV DNA载量的关系探讨[J]. 医学检验, 2012, 9(21): 96-97.
- 6 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.
- 7 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.
- 8 张兰英, 付金凤, 李晓平, 等. HBV携带者首次初乳和24小时后母乳HBV DNA携带情况比较[J]. 中国妇幼保健杂志, 1999, 14(7): 445-446.
- 9 张永亮. HBV感染产妇血液、初乳、满月乳中HBV DNA载量分析[J]. 临床检验杂志, 2009, 27(5): 392.
- 10 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.
- 11 王建设, 朱启镨, 张公惠, 等. 母乳喂养不影响乙型肝炎病毒母婴传播阻断效果[J]. 中华围产医学杂志, 2003, 6(1): 24-27.
- 12 牟瑞丽, 马玉燕, 李桦, 等. 乙型肝炎病毒携带者母乳喂养的研究[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(1): 20-23.
- 13 左书娥, 马玉兰, 张清涛, 等. 母乳喂养在免疫阻断后HBV携带者中的安全性研究[J]. 中国妇幼保健, 2007, 22(13): 1734-1735.
- 14 Zhang L, Gui X, Fan J, et al. Breast feeding and immunoprophylaxis efficacy of mother-to-child transmission of hepatitis B virus[J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2014, 27(2): 182-186.

(收稿日期: 2013-12-03)

(本文编辑: 孙荣华)

汪雪玲, 易为, 李春梅, 等. 慢性HBV感染产妇血清、初乳和成熟乳中HBV DNA含量分析及临床意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(3): 414-417.