

## 产妇血清 HBV DNA 含量对乳汁和新生儿血清 HBV DNA 浓度的影响

彭其才, 许成芳, 滕奔琦, 侯红瑛\*

(中山大学附属第三医院产科, 广东 广州 510630)

**摘要:**【目的】探讨乙型肝炎病毒携带产妇血清 HBV DNA 含量对乳汁和新生儿血清中 HBV DNA 含量的影响,以指导孕期处理和母乳喂养。【方法】选择乙型肝炎病毒携带产妇 145 例,采用荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)技术对产妇血清、母乳和新生儿血清 HBV DNA 进行检测,并将产妇血清 HBV DNA 浓度分 3 级,分析产妇血清不同 HBV DNA 浓度对乳汁及新生儿血清 HBV DNA 浓度的影响。【结果】血清 HBV DNA < 500 copies/mL 的产妇 74 例,乳汁中检出 HBV DNA 阳性为零,新生儿血清 HBV DNA 阳性 1 例;血清 HBV DNA 浓度为 500 ~ 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL 产妇 30 例,乳汁中检出 HBV DNA 阳性为 3 例,新生儿血清 HBV DNA 阳性 1 例;血清 HBV DNA 浓度为 ≥ 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL 产妇 41 例,乳汁中检出 HBV DNA 阳性为 36 例,阳性率为 87.8%,新生儿血清 HBV DNA 阳性仅 3 例。【结论】产妇血清中 HBV DNA ≥ 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL 时,乳汁中 HBV DNA 阳性率大幅度增加,而当产妇血清 HBV DNA 浓度小于 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL,乳汁中 HBV DNA 检出率极低。产妇血清 HBV DNA 浓度对宫内感染影响不大。

**关键词:** HBV DNA; 母婴传播; 母乳喂养; 荧光定量聚合酶链反应

**中图分类号:** R71      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1672-3554(2010)05-0729-02

## Effect of Maternal Serum HBV-DNA Concentration on Breast Milk of Postpartum Women and Neonatus with Chronic HBV Infection

PENG Qi-cai, XU Cheng-fang, TENG Ben-qi, HOU Hong-ying\*

(Department of Obstetrics, The Third Affiliated Hospital, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510630, China)

**Abstract:** 【Objective】 To investigate the effect of maternal HBV-DNA concentration on that of the breast milk of postpartum and neonatus with chronic HBV infection. So as to guide the treatment during pregnancy and breast feeding. 【Methods】 HBV DNA levels in serum, breast milk, and neonatus serum were detected by fluorescent quantitative polymerase chain reaction in 145 postpartum women with chronic HBV infection. Serum HBV DNA was graded into three levels. The effect of different grade of maternal serum HBV DNA on the breast milk and neonate was analyzed. 【Result】 Seventy-four cases of maternal serum HBV DNA quantity were < 500 copies/mL, two of their breast milk HBV-DNA quantity were positive, one neonatal serum HBVDNA quantity was positive. Thirity cases of maternal serum HBV DNA quantity ranged of 500 ~ 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL, 3 cases showed positive in breast milk, one neonatal serum HBV-DNA quantity showed positive. Forty-one cases of maternal serum HBV DNA quantity were > 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL, the HBV DNA positive rate in breast milk reached to 87.8% (36 cases), only three cases neonatus showed positive in there serum HBV DNA quantity. 【Conclusions】 When maternal serum HBV DNA quantity goes beyond > 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL, the HBV DNA positive rate in breast milk increases sharply, when serum HBV DNA quantity goes below 1.0 × 10<sup>6</sup> copies/mL, the HBV DNA positive rate in breast milk is very low. Maternal serum HBV DNA concentration has little effect on intrauterine infection.

**Key words:** HBV DNA; maternal transmission; milk breast; fluorescent quantitative polymerase chain reaction

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2010, 31(5): 729-730; COV3]

我国是乙型肝炎病毒(HBV)感染高发区,陈志英等<sup>[1]</sup>调查报道产妇 HBV 感染率高达 23.51%。如何降低 HBV 感染率,阻断 HBV 的母婴传播是研究重点。目前对于乙肝携带者妊娠后应用乙肝免疫球蛋白阻断 HBV 宫内感染的效果<sup>[2-4]</sup>和产后母乳喂养会否传染 HBV 仍存在争议<sup>[5-6]</sup>。乙肝

病毒 DNA 是判断传染性最为客观的指标<sup>[7]</sup>。本文用荧光定量 PCR 技术检测乙型肝炎病毒携带产妇血清、乳汁和新生儿血清中 HBV DNA 含量,分析产妇血清不同 HBV DNA 浓度对乳汁和新生儿血清 HBV DNA 浓度的影响,为孕期处理和产后母乳喂养提供指导依据。

收稿日期: 2010-04-12

基金项目: 广东省科技计划项目(2009B060700107)

作者简介: 彭其才, 学士, 主治医师, 研究方向: 围产医学, E-mail: fye1@163.com; \* 通信作者: 侯红瑛, E-mail: gdzhhy@163.com

## 1 材料与方法

### 1.1 检测对象

选择2009年1月至2009年12月间在我院产科分娩的乙型肝炎病毒携带产妇145例,其平均年龄28.8岁,最大40岁,最小21岁。

### 1.2 标本采集方式

血清:产妇空腹静脉采血2 mL、新生儿出生后24 h内乙肝被动-主动免疫前股静脉采血2 mL,均在2 h内分离血清备用。乳汁:清洗乳房后,挤乳汁0.5~1.0 mL于消毒试管内立即送检。

### 1.3 HBV DNA 荧光定量 PCR 检测

试剂盒由中山大学达安基因诊断中心提供,荧光PCR扩增仪、ASAP专用软件由美国Biotronics公司提供,并严格按照KWOK等提出的防止PCR污染措施实施。(1)标本处理:血清用水平离心机(EPPENDORF 5417R,  $r = 6 \text{ cm}$ ) 1 500 r/min离心5 min,吸取上层血清备用;乳汁用水平离心机5 000 r/min离心10 min,弃上层脂肪,取中层乳清备检。(2)HBV DNA提取(血清和乳汁标本处理同):①取100  $\mu\text{L}$ 血清加入等量DNA浓缩液,用振荡器振荡混匀5 s;②12 000 r/min离心10 min;③去上清,沉淀中加入20  $\mu\text{L}$  DNA提取液,振荡器剧烈振荡混匀5~10 s,瞬时离心数秒,100  $^{\circ}\text{C}$ 恒温处理( $10 \pm 1$ )min;④12 000 r/min离心5 min,备用;(3)PCR扩增:①加样——取PCR反应管若干,分别加入处理后的样品上清液2  $\mu\text{L}$ ,8 000 r/min离心数秒,放入仪器样品槽;②编辑——按对应顺序设置阴性质控品、阳性定量参考品以及未知标本,并在Name栏中设置样品名称。选中所有设置样品孔,点击工具栏中P键,选择PR1 Primer1后关闭窗口。打开instrument窗口,按药盒要求设置循环条件,保存文件,运行;③结果分析——反应结束后保存检测数据文件,在Analysis菜单下选择Analyze自动分析结果;④到Tray窗口,记录未知标本数值(C)。“C”表示样品的浓度或含量;标本HBV DNA浓度 $\geq 500$

copies/mL为阳性<sup>[8]</sup>。

### 1.4 数据处理

采用EXCEL内统计软件进行数据处理,计量资料用 $t$ 检验,计数资料用卡方检验。当 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 乙肝携带者产妇血清HBV DNA情况

血清HBV DNA  $< 500$  copies/mL者(阴性)74例,占51%;血清HBV DNA浓度为 $500 \sim 1.0 \times 10^6$  copies/mL者30例,占20.7%;血清HBV DNA浓度为 $\geq 1.0 \times 10^6$  copies/mL者41例,占28.3%。

### 2.2 乙肝携带者产妇乳汁HBV DNA情况

乳汁HBV DNA  $< 500$  copies/mL者(阴性)106例占73.1%, $\geq 500$  copies/mL者(阳性)39例占26.9%。①血清HBV DNA  $< 500$  copies/mL的产妇74例,乳汁中检出HBV DNA阳性为零;②血清HBV DNA浓度为 $500 \sim 1.0 \times 10^6$  copies/mL产妇30例,乳汁中检出HBV DNA阳性为3例,阳性率10%;③血清HBV DNA浓度为 $\geq 1.0 \times 10^6$  copies/mL产妇41例,乳汁中检出HBV DNA阳性为36例,阳性率为87.8%。①和②比较: $0.05 > P > 0.01$ ,差异有统计意义;①和③、②和③比较 $P$ 值均 $< 0.01$ ,差异有显著意义。说明 $1.0 \times 10^6$  copies/mL可能是一个界值浓度,产妇血清HBV DNA浓度 $<$ 界值浓度 $1.0 \times 10^6$  copies/mL时,乳汁中HBV DNA阳性率低,当 $\geq$ 界值浓度 $1.0 \times 10^6$  copies/mL时,乳汁中HBV DNA阳性率大幅度增加。

### 2.3 乙肝携带者产妇分娩的新生儿血清HBV DNA情况

表1显示:新生儿血清HBV DNA  $< 500$  copies/mL者(阴性)140例占96.6%, $\geq 500$  copies/mL者(阳性)5例占3.4%。①血清HBV DNA  $< 500$  copies/mL的产妇74例,新生儿血清HBV DNA阳性1例,阳性率1.4%;②血清HBV DNA浓度为 $500 \sim 1.0 \times 10^6$  copies/mL产妇30例,新生儿血清HBV DNA阳性1例,阳性率3.3%;③血清HBV DNA浓度为 $\geq 1.0 \times 10^6$  copies/mL产妇41例,新生儿血清

表1 产妇血清HBV DNA浓度与乳汁HBV DNA及新生儿HBV DNA阳性率的关系

Table 1 The relationship of HBV DNA concentration in maternal serum and milk HBV DNA positive rate  $n(\%)$

|                  | HBV DNA concentration in maternal   |  |  | Total<br>$n = 145$ |
|------------------|-------------------------------------|--|--|--------------------|
|                  | $< 500$ copies/mL<br>$n = 74^{(1)}$ | $500 \sim 1.0 \times 10^6$ copies/mL<br>$n = 30^{(2)}$ | $\geq 1.0 \times 10^6$ copies/mL<br>$n = 41^{(3)}$ |                    |
| Maternal milk    |                                     |  |  |                    |
| HBV DNA negative | 74(100)                             | 27(90)   | 5(12.2)  | 106(73.1)          |
| HBV DNA positive | 0(0)                                | 3(10)  | 36(87.8)   | 39(26.9)           |
| Neonate          |                                     |  |  |                    |
| HBV DNA Negative | 73(98.6)                            | 29(96.7)   | 38(92.7)   | 140(96.6)          |
| HBV DNA Positive | 1(1.4)                              | 1(3.3)   | 3(7.3)   | 5(3.4)             |

Of maternal milk, 1) compared with 2),  $P < 0.05$ ; 1) or 2) compared with 3),  $P < 0.01$ . Of neonatal blood serum, 1), 2), 3) were compared,  $P > 0.05$

HBV DNA 阳性仅 3 例,阳性率为 7.3%。①和②、①和③、②和③比较  $P$  值均  $> 0.05$ , 差异没有统计学意义,表明胎儿宫内感染与孕妇血清中 HBV DNA 浓度关系不大。

### 3 讨论

#### 3.1 关于 HBV 携带者的母乳喂养问题

2005 年我国首发了慢性乙型肝炎防治指南,在母婴垂直传播的预防中明确提出新生儿在出生 12 h 内注射 HBIG 和乙型肝炎疫苗,可接受 HBsAg 阳性乳汁<sup>[5]</sup>。但也有持不同观点,Hill 等<sup>[6]</sup>认为乳汁中 HBV 复制标志物 HBsAg、HBeAg 和 HBV DNA 是具有传染性的直接指标不宜哺乳。

乙型肝炎病毒核酸基因(HBV DNA)是乙肝病毒的遗传物质基础,是反映 HBV 复制及传染性的直接指标。从本研究结果看,乙肝携带者产妇血清 HBV DNA 有 51% 阴性,49% 阳性。在血清 HBV DNA 阴性产妇中,其乳汁中 HBV DNA 全部阴性;在血清 HBV DNA 的阳性的产妇中,当血清 HBV DNA 浓度小于  $1.0 \times 10^6$  copies/mL 时,乳汁中 HBV DNA 阳性率低,仅 10%,当血清 HBV DNA 浓度达到或超过界面浓度  $1.0 \times 10^6$  copies/mL 时,乳汁中 HBV DNA 阳性率高达 87.8%,阳性率大幅度增加。说明产妇血清 HBV DNA 分泌到乳汁中可能具有浓度界值(Tram 等<sup>[9]</sup>将  $1.0 \times 10^6$  copies/mL 作为低、高危的分界线),当产妇血清 HBV DNA 达到或超过界面浓度时,乳汁中 HBV DNA 阳性率大幅显著增加,而小于这个界面浓度时乳汁中 HBV DNA 阳性率低,但仍比血清 HBV DNA 阴性产妇高,差异有统计意义。

产妇血清 HBV DNA 分泌到乳汁存在界面浓度的发现,对指导乙肝病毒携带者母乳喂养,预防 HBV 母婴传播具有重要的意义。纯母乳喂养是目前被视为婴儿最理想的天然食品,母乳中含有 HBV DNA 就有可能诱发乙肝病毒感染<sup>[7]</sup>。根据我们的检测结果,乳汁 HBV DNA 阳性的产妇,不宜母乳喂养应改为人工喂养;当产妇血清和乳汁 HBV DNA 均阴性时可以放心实行母乳喂养;当产妇血清 HBV DNA 阳性浓度在  $500 \sim 1.0 \times 10^6$  copies/mL 时,检测乳汁 HBV DNA 浓度确定可否母乳喂养;当产妇血清 HBV DNA 浓度达到或超过界面浓度  $1.0 \times 10^6$  copies/mL 时,HBV DNA 容易大量进入乳汁,建议也不宜母乳喂养,若一定要母乳喂养,必需定期检测乳汁 HBV DNA 含量,或应用乙肝免疫球蛋白(HBIG)将产妇血清 HBV DNA 浓度降低至界面浓度以下,以减少 HBV 母婴传播的危险<sup>[7]</sup>。

#### 3.2 关于 HBV 携带者的胎儿宫内传染

检测 HBV DNA 也是诊断宫内感染及 HBV 传染性最为客观的指标<sup>[2,7]</sup>。我们的研究结果发现,145 例乙肝携带者产妇中,血清 HBV DNA 阳性率 49%,新生儿血清 HBV DNA 阳性率为 3.4%,与潘文涛等<sup>[10]</sup>报道相近。产妇血清中 HBV DNA 浓度对胎儿宫内感染率影响不大( $P > 0.05$ ),与韩忠厚等<sup>[2]</sup>研究结论相似。HBsAg 阳性产妇中 49% 具传染性,而宫内感染率才 3.4%,说明母体内 HBV 宫内传播受到阻隔,而这个阻隔因素,主要是胎盘的屏障作用。

综上所述,产妇血清中 HBV DNA 分泌到乳汁有浓度界值而对胎儿宫内感染却不表现浓度界值,其机理值得进一步研究。但界面浓度的发现为 HBV 感染产妇选择是否母乳喂养提供了指导依据,同时,产妇血清中 HBV DNA 浓度对胎儿宫内感染率影响不大提示孕期抗病毒治疗对预防宫内感染意义不大。

#### 参考文献:

- [1] 陈志英,孟和. 妊娠妇女乙型肝炎流行病学调查[J]. 中国妇幼保健,2008,23(24):3460-3461.
- [2] 韩忠厚,钟连华,王佳,等. 妊娠晚期孕妇注射乙型肝炎免疫球蛋白对其血清 HBV DNA 及新生儿抗 HBs 的影响[J]. 中华内科杂志,2007,46(5):376-378.
- [3] Yuan J, Lin J, Xu A, et al. Antepartum immunoprophylaxis of three doses of hepatitis B immuno-globulin not effective: a single-centre randomized study [J]. J Viral Hepat, 2006, 13(9): 597-604.
- [4] Emilio Palumbo. Lamivudine for chronic hepatitis B: a brief review [J]. Braz J Infect Dis, 2008, 12(5): 356-367.
- [5] 中华医学会肝病学会感染病学分会.慢性乙型肝炎防治指南[J]. 中华肝脏病杂志,2005,13(12):881-891.
- [6] 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): 1049-1054.
- [7] Silvia S. Hepatitis B virus and pregnancy [J]. Hepatitis Annual, 2007, 4(1): 12-23.
- [8] 刘穗玲,李小毛,杨越波,等. 乙型肝炎病毒携带者妊娠对新生儿的影响探讨[J]. 中国妇幼保健,2003,18(8):729-730.
- [9] Tram T. Management of hepatitis B in pregnancy: Weighing the options [J]. Clin J Med, 2009, 76(3): 25-29.
- [10] 潘文涛,尹玉竹,谌小卫,等. HBV 宫内感染预测指标的探讨[J]. 中山大学学报:医学科学版,2010,31(1):110-113.

(编辑 徐杰)