

## 用套式多聚酶链反应技术监测乙型肝炎病毒的母婴垂直传播

黄晓军<sup>1</sup> 黄雅蓉<sup>1</sup> 郑惠童<sup>1</sup> 符玉良<sup>1</sup> 陈火胜<sup>2</sup>

<sup>1</sup>(广州市妇婴医院, 广州 510180)

<sup>2</sup>(中山医科大学微生物学教研室, 广州 510089)

R373.21  
R512.620.1

**A 摘要** 用套式多聚酶链反应(Nested-PCR)技术对169对HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性孕妇及其新生儿外周血清进行了HBV-DNA检测。103对HBsAg阳性孕妇及其新生儿外周血清中HBV-DNA阳性率分别为72.8%和33.0%;66对HBsAg和HBeAg双阳性的孕妇及其新生儿外周血清中HBV-DNA阳性率分别为86.4%和43.9%。对55例HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性产妇产后的初乳进行了HBV-DNA检测,结果HBV-DNA阳性率为36.4%。结果表明HBsAg和HBeAg双阳性的孕妇及其新生儿外周血清HBV-DNA检出率较HBsAg单阳性的孕妇及其新生儿要高,其初乳中HBV-DNA的检出率也高。还对105例注射了乙肝疫苗及高价乙肝特异性免疫球蛋白的6月龄婴儿的外周血清进行了HBV-DNA检测,结果有23例阳性。

**关键词** 套式多聚酶链反应,血清,初乳,乙型肝炎病毒,母婴传播

聚合酶链反应; 血清

乙型肝炎病毒(HBV)感染在我国是一个非常突出的问题,已经引起了国内外的广泛重视,成为我国公共卫生的一个重要问题。据统计,全球慢性HBV携带者有2~3亿,多数在远东,我国为高发区。妊娠妇女为HBV的易感者,孕妇感染了HBV后,可以通过母婴垂直传播给新生儿。在感染的婴儿中大部分将成为慢性携带者,严重影响了婴幼儿的健康成长<sup>[1]</sup>。因此有必要对HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性孕妇进行密切监测,并探讨HBV母婴垂直传播的规律及可能机制,为更好地预防和阻断其传播提供依据。本研究用套式多聚酶链反应技术对169对HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性孕妇及其新生儿进行外周血清HBV-DNA进行检测,对55例产妇的初乳进行了HBV-DNA检测。此外还对其中105例6月龄的婴儿进行了外周血清HBV-DNA检测。

### 材料与方 法

#### 1 实验材料

##### 1.1 孕妇及其新生儿血清

孕妇外周血取自1993年3月至1995年3月我院产检HBsAg/HBeAg阳性孕妇(妊娠28周后);配对的新生儿出生后当天抽取外周血,血液经离心后,取血清置-20℃冷存,备用。

本文于1995年12月12日收到,1996年5月12日修回

• 本课题受广州市卫生系统青年科研基金资助

1.2 6月龄婴儿血清 注射乙肝疫苗及高价乙肝特异性免疫球蛋白的6月龄婴儿来我院复查(未配对),抽取外周血,离心后,取血清置-20℃冻存,备用。

1.3 初乳 HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性产妇产后2~4天取初乳1.5 mL置-20℃冷存备用(未配对)。

1.4 化学试剂和酶类 Taq DNA聚合酶购自英国HT公司, NP<sub>40</sub>、Tween<sub>20</sub>购自美国Sigma公司,蛋白酶K购自中国华美生物工程公司,4×dNTP购自上海复生生物工程研究所。

## 2 用于PCR的样品制备

2.1 血清 将12.5 μL血清加入到112.5 μL的含蛋白酶K、0.45% NP<sub>40</sub>、0.45% Tween<sub>20</sub>的1×Taq DNA酶缓冲液中,置50℃温育2 h;95℃ 10 min灭活蛋白酶K,然后从中取出25 μL进行PCR<sup>[2]</sup>。

2.2 初乳 取1 mL乳汁于1.5 mL Eppendorf管中,5000 r/min离心5 min,去上清,沉淀经PBS洗二遍后,用200 μL TNE重悬,加入10% SDS,20 μL, Proteinase K 8 μL(20 mg/mL),37℃过夜。酚-氯仿抽提后,乙醇沉淀。沉淀溶于20 μL灭菌双蒸水中,取10 μL作模板进行PCR<sup>[3]</sup>。

## 3 PCR引物及反应条件

第一对引物 HBV C<sub>1</sub>R:GAATTTGGAGCTACTGTCC, HBV C<sub>1</sub>L:CGAGGGAGTTCTTCTTCTAGG,扩增片段为471 bp(从1924 nt至2394 nt)。第二对引物即套式引物 HBV C<sub>1</sub>RN:TGCCTTCTGACTTCTTTCC, HBV C<sub>1</sub>LN:GTGTTGATAAGATAGGGGC,扩增片段为372 bp(从1958 nt至2329 nt)。此二对引物均由台湾长庚医学院包家驹教授惠赠。

PCR反应总体积为50 μL,其中有血清或乳汁中提取的HBV DNA模板, Tris-HCl(pH 8.0)10 mmol/L, KCl 50 mmol/L, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mmol/L, 4×dNTPs 100 μmol/L,上、下游引物均为20 pmol/L,此外还含有1单位的Taq DNA多聚酶,PCR反应经94℃,30";55℃,30";72℃,60"循环35次,最后一次循环后于72℃延伸10 min,结束反应。同时用正常孕妇血清或正常产妇初乳做阴性对照,用重组HBV DNA质粒为阳性对照。第一次PCR结束后,从中取出2 μL产物为模板再做套式PCR反应,体积及条件均与第一次相同。

以上PCR反应后,取每个反应样本终产物10 μL进行1.5%琼脂糖凝胶电泳,凝胶经EB染色后在紫外光下观察结果并拍照,若有一条与阳性对照相应大小的DNA片段(约370 bp)出现,则为阳性。

## 结 果

1 孕妇及其新生儿血清中HBV DNA的套式PCR检测 对169对HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性孕妇及其新生儿外周血清进行了Nested-PCR检测,103对HBsAg单阳性母亲及其新生儿HBV-DNA阳性率分别为72.8%和33.0%(第一次PCR的阳性率分别为54.4%和15.5%)。66对HBsAg和HBeAg双阳性母亲及其新生儿外周血清HBV-DNA阳性率分别为86.4%和43.9%(第一次PCR的阳性率分别为65.2%和24.2%)。

2 HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性孕妇及其新生儿外周血清中HBV-DNA与孕妇外周血清中HBsAg、HBeAg之间的关系 见表1。

3 乳汁中HBV-DNA的套式PCR检测 对55份HBsAg和HBsAg/HBeAg阳性母亲的初乳进行了Nested-PCR检测,HBsAg单阳性母亲的初乳中HBV-DNA阳性率为25%(第一次PCR的阳性率为11.1%)。HBsAg和HBeAg双阳性母亲的初乳中HBV-DNA的阳性率为57.9%(第一次PCR的阳性率为31.6%)。

4 HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性母亲外周血及其初乳中的HBV DNA与血清中HBsAg、HBeAg之间的关系 结果见表2。

表1 HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性母亲及其新生儿外周血清中HBV-DNA阳性率

Tab.1 The positive rate of HBV-DNA in serum of the positive of HBsAg or HBsAg/HBeAg mothers and their neonates

类型 Types of serum	例数 Detecting cases	母亲 HBV-DNA 阳性(%) Positive of HBV-DNA in mothers (percentage)	新生儿 HBV-DNA 阳性(%) Positive of HBV-DNA in neonates (percentage)
乙肝表面抗原阳性 HBsAg(+)	103	75(72.8%)	34(33%)
乙肝表面抗原和e抗原阳性 HBsAg and HBeAg(+)	66	57(86.4%)	29(43.9%)

表2 HBsAg及HBsAg/HBeAg阳性母亲外周血清及其初乳中的HBV-DNA与其血清中HBsAg及HBeAg之间的关系

Tab.2 The relationship between the HBV-DNA in positive of the HBsAg or HBsAg/HBeAg mother's serum and colostrum and HBsAg or HBeAg of their serum

类型 Types of serum	例数 Detecting cases	血清 HBV-DNA 阳性(%) Positive of HBV-DNA in serum (percentage)	初乳中 HBV-DNA 阳性(%) Positive of HBV-DNA in colostrum(percentage)
乙肝表面抗原阳性 HBsAg(+)	36	24(66.7%)	9(25%)
乙肝表面抗原和e抗原阳性 HBsAg and HBeAg(+)	19	18(94.7%)	11(57.9%)

5 乙肝疫苗及免疫球蛋白的作用 105例注射了乙肝疫苗及高价乙肝特异性免疫球蛋白的6月龄婴儿外周血清中HBV-DNA阳性率为21.9%(第一次PCR的阳性率为8.6%)。

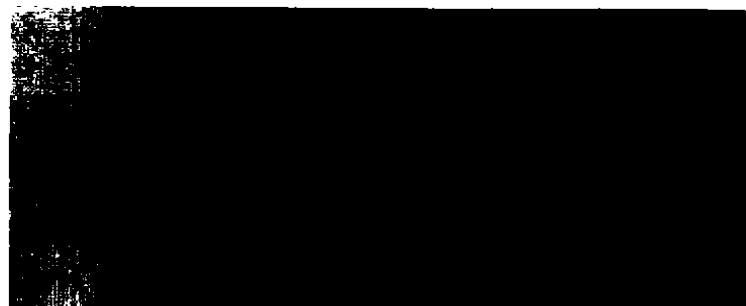


图1 血清HBV-DNA经Nested-PCR扩增后的琼脂糖凝胶电泳(1.5% gel)

1, 2, 3, 6, 7, 8 为阳性血清标本; 4 为阴性血清标本;

5 为分子量标记 DNA/HindIII; 9 号为阴性对照; 10 号为阳性对照

Fig 1 Electrophoresis of Nested-PCR for serum (1.5% gel)

1, 2, 3, 6, 7, 8; the positive serum specimen; 4; the negative serum specimen;

5; MWA DNA/HindIII; 9; negative control; 10; positive control



图 2 初乳中 HBV-DNA 经 Nested-PCR 扩增后的凝胶电泳(1.5% 胶)

1, 2, 5, 6, 8, 9 为阴性初乳标本; 3, 4 为阳性初乳标本;

7 为分子量标记  $\lambda$ DNA/HindIII; 10 为阴性对照; 11 为阳性对照

Fig 2. Electrophoresis of Nested-PCR for colostrum (1.5% gel)

1, 2, 5, 6, 8, 9: the negative colostrum specimen;

3, 4: the positive colostrum specimen; 7: MWA DNA/HindIII;

10: negative control; 11: positive control

## 讨 论

HBV 携带者孕妇通过母婴垂直传播的方式将 HBV 传染给新生儿是一个很严重的问题, 国内外报道母婴传播的机率为 40~90%<sup>[4-7]</sup>, 由于所用的检测方法及标本不同而得出的结果也不完全相同。本实验抽取新生儿当天的外周血进行血清 HBV-DNA 套式 PCR 检测, 若新生儿 HBV-DNA 阳性则说明有病毒血症, 可认为是宫内感染所致。我们采用的套式 PCR 技术既保持了 PCR 的特异性, 又可提高其敏感性, 且无需做核酸杂交检测, 只根据 EB 染色的 DNA 电泳带型即可直接判断结果。在实验中作者采取了一些措施, 如枪头、离心管等经高压后均一次性使用, 每一次 PCR 反应均作阴阳性对照, 避免了套式 PCR 中易出现的假阳性<sup>[8]</sup>。因此本实验得出的结果准确可靠, 可以反映宫内感染的发生率。母婴传播除宫内感染外还有其他方式引起, 如分娩时经产道感染、产后密切接触以及哺乳等, 其结果新生儿感染率较低, HBsAg 单阳性孕妇所生新生儿感染率为 33.0%, 而 HBsAg 和 HBeAg 双阳性孕妇所生新生儿的感染率为 43.9%, 以上结果表明 HBV 母婴垂直传播中很大一部分为宫内感染引起, 为垂直传播的一个主要途径。

我们还对 55 例 HBsAg 及 HBsAg/HBeAg 阳性产妇产后的初乳进行了套式 PCR 检测, HBsAg 阳性母亲的初乳中 HBV-DNA 阳性率为 25%; HBsAg 和 HBeAg 双阳性母亲的初乳中 HBV-DNA 阳性率为 57.9%。这证明 HBV 携带者母亲中有相当一部分人初乳中存在着微量病毒毒粒, 有可能引起一部分新生儿感染 HBV。因此, 这些母亲的母乳喂养是一个值得注意的问题。

以上结果提示, HBsAg 和 HBeAg 双阳性母亲的血清及初乳中 HBV-DNA 阳性率均较 HBsAg 单阳者要高, 并且所生新生儿感染 HBV 的机率也较高, 说明 e 抗原在 HBV 母婴传播

中有着重要作用,应引起重视。

本研究还对105名注射了乙肝疫苗和乙肝高价免疫球蛋白(HBIG)的6月龄婴儿进行了外周血清HBV-DNA检测,结果23例为HBV-DNA阳性,说明新生儿经主动和被动免疫后仍有21.9%的婴儿有病毒血症。出现以上结果可能有下述三种原因:首先是新生儿宫内感染了HBV,导致新生儿对HBV抗原产生耐受性,因而乙肝疫苗失效;第二,早期应用HBIG可能暂时保持婴儿不出现病毒血症,但HBV已经感染了白细胞、肝细胞或其他细胞后又再度复制;第三,可能是该婴儿先天对乙肝疫苗反应性低或是由于出生后水平感染所致<sup>[3]</sup>。以上只是对6月龄婴儿进行的监测,当然还应对这些儿童作进一步的跟踪调查。

本研究仅为套式PCR结果,对其扩增的DNA条带未用HBV特异性探针进行Southern印迹杂交以证实其核酸序列的同源性,尚有欠缺之处,有待以后改进。图1“4”号标本及“9”号阴性对照出现的少许非特异性扩增,应是血清分离时混有少许有核细胞,以至有非乙肝病毒DNA存在所造成的,在以后的实验中应对PCR各项参数进行调整,以控制非特异性扩增的出现。

### 参 考 文 献

- 1 Wong VCW, Ip HMH, Reesink HW *et al.* Prevention of the HBeAg carriers state in newborn infants of mothers who are chronic carriers of HBeAg and HBeAg by administration of hepatitis B vaccine and hepatitis B immunoglobulin. *The Lancet*, 1984, ii: 921-926
- 2 Ianeko S, Miller RH, Feinstone SM *et al.* Detection of serum hepatitis B virus DNA in patients with chronic hepatitis using the polymerase chain reaction assay. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 312-316
- 3 Mitsuda T, Mori T, Ookawa N *et al.* Demonstration of mother-to-infant transmission of hepatitis B virus by means of polymerase chain reaction. *The Lancet*, 1989, ii: 886-888
- 4 朱启容,段恕成,徐华芳等.乙型肝炎病毒从母亲到婴儿的产前传播.中华传染病杂志,1989,7:159
- 5 Beasley RP, Hwang LY, Lee GCY *et al.* Prevention of perinatally transmitted hepatitis B immunoglobulin and hepatitis B vaccine. *The Lancet*, 1983, ii: 1099-1102
- 6 Xu ZY, Liu CB, Francis DP *et al.* United States-China cooperative study group on hepatitis B. Prevention of perinatal acquisition of hepatitis B virus carriage using vaccine: Preliminary report of a randomized double-blind placebo-controlled and comparative trial. 1985, *Pediatrics*. 76: 713-718
- 7 Lo KT, Tsaï YT, Lee SD *et al.* Immunoprophylaxis of infection with hepatitis B virus in infants born to hepatitis B surface antigen-positive carrier mother. *Journal of Infectious Diseases*. 1985, 152: 817-822
- 8 王斌,邵一鸣,曾毅. HIV-Pol基因的套式PCR检测.病毒学报,1994,12: 357-363

## Detection of Hepatitis B Virus in Perinatal Transmission by Nested Polymerase Chain Reaction

Huang Xiaojun Huang Yarong Zheng Huitong  
Fu Yuliang Cheng Huosheng \*

(Guangzhou Maternal and Neonatal Hospital, Guangzhou 510180)

\* (Department of Microbiology, Sun Yat-sen University of  
Medical Science, Guangzhou 510089)

A high sensitive method of nested - polymerase chain reaction (Nested - PCR) was established to detect HBV - DNA in peripheral serum from 169 HBsAg or HBsAg/HBeAg positive pregnant women and their neonates. Positive of HBV - DNA was 72.8% in 103 positive of HBsAg mothers and 33.0% in their neonates. In the other 66 both HBsAg and HBeAg positive mothers and their neonates, the HBV - DNA positive was 86.4% and 43.9%. Fifty five samples of the colostrum from 169 HBsAg or HBsAg/HBeAg positive mothers were detected, the HBV - DNA was found in 20 mothers. These results suggested the e antigen was important in HBV perinatal transmission. Additional detection was made in 105 cases of 6 months infants from above neonates after injection of NBV vaccine and hepatitis B immunoglobulin, 23 positive samples were found in serum.

**Key words** Nested - PCR, Serum, Colostrum, HBV, Perinatal - transmission