

• 临床研究 •

# 聚合酶链反应在乙型肝炎母婴传播基因诊断中的应用研究

陈晓

(福建医科大学附属第一医院输血科,福州 350005)

**摘要:**目的 探究聚合酶链反应在乙型肝炎(简称乙肝)母婴传播基因诊断中的临床价值。方法 使用聚合酶链反应对 2014 年 3 月至 2015 年 3 月收治的已感染 HBV 孕产妇 108 例与其新生儿股静脉血液 HBV-DNA 水平进行检测。结果 单纯性乙肝患者血清内 HBeAg 阳性组的 HBV-DNA 水平明显比抗-HBc 和抗-Hbe 阳性组高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。HBeAb 阳性组和 HBcAb 阳性对照组中有部分患者的 HBV-DNA 水平较高,证实胎儿出现宫内感染的概率和母体血清 HBV-DNA 水平存在关联性,其母体中 HBV-DNA 水平升高,胎儿出现宫内感染的概率也就越大。结论 使用定量检测的方式对孕产妇血液内 HBV-DNA 水平加以检测,可以全面反映出孕妇疾病的传染性,进而实现预计 HBsAg 阳性孕产妇胎儿出现宫内感染的风险强弱,之后有针对性地对高危人群实施治疗,全面减少其宫内感染的发生率。

**关键词:**宫内感染; 乙型肝炎; 荧光定量 PCR; HBV-DNA; 母婴传播

**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2016.16.048

**文献标识码:**A

**文章编号:**1673-4130(2016)16-2322-02

当前,乙型肝炎(乙肝)病毒(HBV)的母婴传播力已经成为学术界所关心的问题<sup>[1]</sup>。聚合酶链反应(PCR)首次由外国学者 Saiki 提出,该检测方式当前已经被应用在多种疾病的诊断,在诊断 HBV 感染方面也突显出重要地位。当前 HBV 宫内感染已经被国内外学者所证实<sup>[2]</sup>。结合实际情况,本文选择 2014 年 3 月至 2015 年 3 月本院收治的已感染 HBV 的孕妇(108 例)血清和新生儿静脉血 HBV-DNA 为研究标本,使用酶联免疫吸附试验(ELISA)对其血清乙肝标记物进行研究,全面观察孕产妇血清内 HBV 水平和胎儿宫内感染的关系,现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选择 2014 年 3 月至 2015 年 3 月本院收治的已感染 HBV 孕产妇 108 例与其新生儿股静脉血液 HBV-DNA 为研究标本。年龄 23.6~33.7 岁,平均(27.4±3.6)岁。经临床诊断,孕产妇符合最新全国病毒性肝炎会议中制定的关于乙肝的诊断标准。所有孕妇均为单胎生产,新生儿平安降生。在其怀孕 32 周时,每月为其注射高价免疫球蛋白,并对其分娩前后的外周血加以采集,同时使用乙肝疫苗实施全程免疫。在新生儿出生之后 1 d,将 HBV-DNA 或者 HBsAg 阳性视为宫内感染。现依照孕妇血清 ELISA 检测结果,将其分成 HBeAg 阳性对照组(64 例),HBeAb 阳性组(25 例)和 HBcAb 阳性对照组(19 例)。各组受试者年龄等基线资料差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

## 1.2 方法

**1.2.1 HBV-DNA 的定量检测** 本实验所使用的试剂盒均由北京诺康生物制剂有限公司生产,其引物序列为 P1:5'-ATC CTG CTG CTA TGC CTC ATC TT-3'(23 bp),P2:5'-ACA GTG GGG GAA AGC CCT ACG AA-3'(23 bp),荧光探针的序列为 5'-TGG CTA GTT TAC TAG TGC CAT TTG-3'(25 bp)。HBV-DNA 的相关标准由本院诊断中心提供。本实验使用碱裂解法,在血清内提取出 HBV-DNA<sup>[3]</sup>。将各个反应管放在全自动荧光检测设备中,扩增条件如下:在 93℃ 环境中预变性 2 min,后按照 93℃ 45 s、55℃ 120 s 做 40 个循环。使用德国西门子公司生产的全自动荧光 PCR 设备进行相关工作。在实施 PCR 过程中,持续性检测反应体系内的荧光信号改变情况,如果信号加强到某一个特定阈值(结合荧光信号基线平均值与标准值差,算出将 99.7%置信度大于平均值,即为阈

值)的时候,循环次数就会被记录,这个循环参数和 PCR 体系内初始 DNA 对数之间存在线性关系,后使用标准化 HBV-DNA 创建回归方程,结合标本的循环次数值,能够精准地算出 DNA 数量,经由计算机可分析出定量结果,最终值为对数值。

**1.2.2 质量控制** 各项试验中设置的双份阴性对照与 5 个含量不一的 HBV-DNA 阳性对照,在各个标准中选择两个孔当作计算结果,本实验使用 Kwok 提出的预防污染方式进行相关操作。

**1.2.3 HBV 血清标志物检测** 对于该项标志物,本实验使用 ELISA 进行检测,试剂提供厂家为北京诺康生物制剂有限公司。

**1.3 统计学处理** 使用 SPSS20.0 专业统计学软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验;计数资料以率表示,组间比较采用  $\chi^2$  检验;以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 标准化 HBV-DNA 定量分析结果** HBV 定量阳性质量控制标准样品经过荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR),将初始复制数对数视为横坐标,将循环阈值当作纵坐标,可以得出直线型标准曲线,经计算,其斜率为 -2.336。阳性关系系数为 0.956 2。上述结果证实,使用循环次数实施定量的精准性。

**2.2 108 例 HBV 感染者血清内 HBV-DNA 水平和标志物之间的关系** 血清 HBeAg 阳性对照组的 HBV-DNA 水平明显高于 HBeAb 阳性组与 HBcAb 阳性对照组,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。在阳性 HBeAb 阳性组和 HBcAb 阳性组内,一部分孕产妇 HBV-DNA 呈现出了较高水平。HBeAg 阳性对照组, HBeAb 阳性组和 HBcAb 阳性对照组的孕产妇血清 HBV-DNA 对数均值分别是  $4.98 \pm 1.02$ 、 $3.62 \pm 0.88$ 、 $2.96 \pm 1.06$ ,两两相比,组间数据差异有统计学意义( $P<0.05$ )。详情见表 1。

**2.3 108 例新生儿相关情况** 本次实验相关研究结果证实,105 例新生儿的 HBV-DNA 水平在常范围内,3 例 HBV-DNA 水平为  $2.3 \times 10^3$  copy/ $\mu$ L,与之相对应的标志物为 HBeAg 和 HBcAb 阳性,其母体的乙肝标志物为 HBcAb、HBcAg 和 HBeAg,新生儿 DNA 定量情况为  $2.5 \times 10^5$  copy/ $\mu$ L。在本次试验中,新生儿静脉 HBcAb 阳性共计 43 例。HBsAg 和 HBcAb 阳性共计 7 例。HBcAb, HBsAb 和 HBeAb 阳性共计 3 例。

表 1 单纯性 HBV 感染孕产妇血清 HBV-DNA 含量和标志物之间的关联性

小组类别	ELISA 阳性	<i>n</i>	DNA 定量阳性[ <i>n</i> (%)]	HBV-DNA 定量范围(copy/ $\mu$ L)
HBeAg 阳性对照组	HBsAg, HBeAg, HBcAg	64	64(100.00)	$1.3\times 10^2\sim 6.5\times 10^6$
HBeAb 阳性组	HBeAb, HBeAg, HBsAg	25	17(68.00)	$1.2\times 10^3\sim 3.8\times 10^5$
HBcAb 阳性对照组	HBcAb, HBsAg, HBeAg	19	8(42.11)	$4.36\times 10^4\sim 5.19\times 10^5$

注:HBV-DNA 定量如果小于  $10^2$ , 可以被视为阴性, 无需计算在内。

3 讨 论

随着我国医疗技术的不断进展, FQ-PCR 已经成为了实施基因诊断的主要方式。从最早的斑点杂交法开始, 到后来的 PCR-ELISA 等, PCR 的定量精准性和假阳性污染为临床工作人员面临的两个难题<sup>[4]</sup>。这主要体现在以下两个方面: 第一, 使用上述方式实施检测, 和各式各样的 PCR 后续处理分不开, 这些处理过程会令数量庞大的 PCR 生成物弥散到空气中, 进而出现假阳性现象<sup>[5]</sup>。第二, 上述方式的定量法主要是针对 PCR 产物进行的, 但 PCR 存在的平台效应在很大程度上影响了 PCR 初始数量与最终产物相关性, 令精准性不佳, FQ-PCR 以常规方式为基础, 增加双标记探测针, 一个标记于探针 5', 被称之为荧光报告基团, 另外一个标记于探测针 3', 被称为荧光抑制剂基团, 上述两个物质可以被构成能量传递结构<sup>[6]</sup>, 探针在没有特异 PCR 出现时, 荧光信号并不会发生改变, 如果存在 PCR 扩增, 探针会在 PCR 过程中被 Taq 酶 5'-3' 活性切断, 抑制作用下降, 报告基团荧光信号提升, 伴随着 PCR 的进展, 其产物越多, 信号越强<sup>[7]</sup>。动态实时定量 PCR 就是基于上述原理进行的。和以往方式存在差异, 这种方法使用全封闭测量, 并不需要对 PCR 进行再次处理, 以防止污染, 在此同时也使用了动态检测技术, 令 Ct 值和初始模板数量呈现出线性关系, 有着较强定量精准性, 另外使用电子监测的方式, 替代既往观察, 灵敏度得以提升<sup>[8]</sup>。

早在 20 世纪 90 年代, 我国就实现了对新生儿的乙肝疫苗接种, 使得新生儿罹患乙肝的概率明显下降, 但值得说明的是, 对于在宫内发生感染的新生儿, 在出生后使用乙肝疫苗并没有特别显著的效果<sup>[9]</sup>, 因此这部分新生儿极易演变成 HBV 携带者。造成宫内感染发生的原因相对复杂, 当前还没有公认性较强的 HBV 宫内检测标准, 目前学术界对新生儿肝脏组织内 HBV-DNA 检测较为理想, 但这种方式实际操作起来相对困难<sup>[10]</sup>。

在本次试验中显示, 孕妇的 HBV-DNA 感染阳性检出率较高, 且呈现为三种表象, 血清 HBeAg 阳性对照组的 HBV-DNA 水平明显比 HBeAb 阳性组与 HBcAb 阳性对照组高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。在阳性 HBeAb 阳性组和 HBcAb 阳性组内, 一部分孕产妇 HBV-DNA 呈现出了较高水平。

证实单纯性乙肝患者血清内的 HBeAg 可以代表 HBV 活跃性, FQ-PCR 可在基因定量其水平进一步证明了 HBeAg 能够全面反映出乙肝复制水平, 在本次试验中可证实, 在出现宫内感染的患儿中, 大部分患者的 HBeAg 呈现出阳性, 且 HBV-DNA 水平较高, 证实 HBeAg 阳性患者, 其新生儿出现宫内感染的概率要比 HBeAg 阴性者大, 证明两者之间存在较强关联性。

对于本试验中涉及的 HBV-DNA 阳性者, 在 HBeAb 与 HBcAb 阳性组内, 部分患者 HBV-DNA 水平超出常规, 证实

HBeAg 水平减少和 HBeAb 与 HBcAb 水平上升并不能表示其病毒复制能力下降或者病情好转。

在本试验中, 有个别案例呈现为 HBeAg 阴性但 HBV-DNA 水平提升, 证实 HBeAg 阴性但 HBV-DNA 阳性者其新生儿依旧可能发生宫内感染。由此能够看出, 使用母体 HBV-DNA 来判断其传染性和宫内发生感染风险更具有说服力。

综上所述, 使用定量检测的方式对孕产妇血液内 HBV-DNA 水平加以检测, 可以全面反映出孕妇疾病传染性, 进而实现预测 HBsAg 阳性孕产妇胎儿出现宫内感染风险的强弱, 之后有针对性地对高危人群实施治疗, 全面减少其宫内感染发生率。

参考文献

[1] 李新新. 人类白细胞抗原-DQB1 基因多态性与家族性乙型肝炎原发性肝癌相关性研究[D]. 太原: 山西医科大学, 2014.

[2] 丁莉莎, 陈曦, 杨志军, 等. 湖南省 HIV-1 和 HBV 合并感染者中 HBV 基因亚型流行情况分析[J]. 中国艾滋病性病, 2011, 17(6): 621-625.

[3] 吕晓婷, 王俊峰, 臧嘉. 乙肝病毒 DNA 与前 S1 抗原在产前检查中的意义[J]. 中国妇幼保健, 2013, 28(1): 166-168.

[4] 张树仁, 王文蓉, 赵丽华, 等. 应用 PCR 病毒定量评价免疫预防对阻断母婴垂直传播乙型肝炎价值的研究[J]. 放射免疫学杂志, 2008, 21(4): 377-380.

[5] 王文欢, 曹建彪. 乙型肝炎病毒相关性肝癌抗病毒治疗的现状[J]. 世界华人消化杂志, 2013, 21(5): 415-420.

[6] 王国婧, 王刚, 董小岩, 等. 用重组 8 型腺相关病毒载体介导的乙型肝炎病毒持续感染小鼠模型评价核苷类似物的抗病毒效果[J]. 生物工程学报, 2013, 29(1): 95-106.

[7] 廖祥伟, 凌云, 李新华, 等. 宿主 IL28B 基因型联合病毒基因型对慢性丙型肝炎抗病毒疗效的预测[J]. 中国病毒病杂志, 2011(1): 35-40.

[8] 谢雯, 闫杰, 赵红. 慢性乙型肝炎联合抗病毒治疗专家共识[J]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2011, 3(2): 224-233.

[9] 闫杰, 谢雯. 慢性乙型肝炎特殊患者抗病毒治疗专家共识: 2014 年更新[J]. 临床肝胆病杂志, 2014, 30(7): 580-587.

[10] 周丽英, 蒋理. 乙型肝炎病毒核酸载量与乙型肝炎病毒大蛋白的相关性研究[J]. 中华疾病控制杂志, 2012, 16(1): 39-42.