

乙型肝炎病毒母婴垂直传播及其相关标志物检测的研究进展

刘金涛

作者单位:010031 呼和浩特市,呼和浩特市第二医院检验科

【摘要】 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)的垂直传播分为母婴垂直传播(mother to infant vertical transmission, MIVT)和父婴垂直传播(father to infant vertical transmission, FIVT)。目前,MIVT 如何阻断已受到广泛关注,但 FIVT 并未得到社会的广泛认可和重视。FIVT 可能也是导致 HBV 慢性感染的重要途径之一,应引起研究人员和临床工作者的高度重视。FIVT 可通过精子使受精卵感染 HBV,从而传播给胎儿,也可通过血液、精液等使孕妇感染 HBV 而间接传播给胎儿。为阻断 FIVT,对父母、婴儿进行 HBV 血清学相关标志物水平的检测显得尤为重要。实验室检测血清学相关标志物主要分为定性检测和定量检测,电化学发光免疫分析法和实时荧光定量聚合酶链反应能够定量检测血清学相关标志物,灵敏度高,检测范围宽,能够检测出低水平 HBV 感染人群,为阻断和降低 MIVT 和 FIVT,确保母婴安全健康提供保障。共价、闭合、环状 DNA 分子可提示活动性 HBV 感染,还可以监测临床治疗效果和评估预后,但目前国内外对其研究较少,共价、闭合、环状 DNA 分子在检测 HBV 中的作用和临床意义尚有待进一步探讨。

【关键词】 父婴垂直传播;母婴垂直传播;乙型肝炎病毒血清标志物;乙型肝炎病毒脱氧核糖核酸;聚合酶链反应;电化学发光免疫分析技术;共价、闭合、环状 DNA 分子

doi: 10.3969/j.issn.1674-7151.2014.04.015

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)感染是一个严重的公众健康问题。究其流行和趋势,预防是关键。我国从 1992 年开始在新生儿中推广乙型肝炎疫苗免疫注射以来,乙型肝炎在国内的蔓延趋势得到了有效控制,新生儿中 HBV 感染率明显下降^[1]。但不可否认的是 HBV 感染仍然是全球性的重大健康问题,是我国当前流行最为广泛、危害性最严重的一种传染病,也是世界范围内导致慢性肝脏疾病最常见的原因之一^[2]。据统计,世界范围内有近二十亿人口感染 HBV,约三亿多人口存在着 HBV 慢性感染,其中约 25% 发展成为肝硬化、肝癌^[3]。对于胎儿及妊娠妇女,HBV 可能会干扰胚胎发育,甚至导致流产等不良后果。

HBV 广泛存在于慢性乙型肝炎(chronic hepatitis B, CHB)患者的体液中,如唾液、泪液、汗液、乳汁、精液和血液,传播途径分为水平传播(如输血、性交、医源性及密切的生活接触等)和父婴、母婴之间的垂直传播。因 HBV 可通过胎盘屏障将母亲体内的病毒传播给胎儿,因此,垂直传播通常是指母婴垂直传播(mother to infant vertical transmission, MIVT)。然而,近年来越来越多的证据显示父亲体内的 HBV 也可传播给婴儿,即为父婴垂直传播(father to infant vertical

transmission, FIVT)。本文就近年来对 FIVT 的研究进展及 HBV 相关标志物的检测在 FIVT 中的应用进展做一综述。

1 HBV 的垂直传播途径

垂直传播是 HBV 的传播途径之一,可分为 MIVT 和 FIVT 两种,通常意义上的垂直传播是指 MIVT,即 HBsAg 阳性的母亲,尤其是同时伴有 HBeAg 阳性的母亲将 HBV 传播给胎儿/婴儿,引起胎儿/婴儿感染的过程。MIVT 可分为产前传播、产时传播及产后传播,后两者是通过接触母亲体液而导致的病毒传播。在亚洲、非洲、南欧和拉丁美洲等地人群 HBsAg 的检出率约为 2%~20%,其中约 30%~50% 的 HBV 感染者是通过 MIVT 获得^[4]。

2 FIVT

2.1 FIVT 的机制 FIVT 也是 HBV 的主要传播途径之一^[5]。HBV 可通过卵细胞或精细胞进入受精卵而传播给胎儿^[6]。已有报道^[7]表明从精液、精子、卵细胞中检测出 HBV-DNA,同时在精子中发现了 HBV-DNA 整合状态,但其确切存在形式、发生机制、病理学意义和流行病学意义尚均有待阐明。父亲血清 HBV-DNA 载量水平与是否发生 FIVT 密切相关,血清 HBV-DNA 载量水平越高,发生 FIVT 的可能性越大。张荣

莲等^[8]研究表明,父亲血清 HBV-DNA 载量水平达到 1.0×10^7 copies/mL 及 HBeAg 阳性是发生 HBV FIVT 的危险因素。乙型肝炎免疫球蛋白和抗 HBV 药物的使用,可能会减少 HBV 经生殖细胞传播的机会。

2.2 FIVT 与 MIVT 的区别与联系 以往对于 HBV 的垂直传播只提到 MIVT,根据近几年的研究结果证实,HBV 还存在 FIVT,只是长期被 MIVT 和婴儿出生后的密切生活接触传播而掩盖。实际上 HBV 感染的男性,其精子中可检出 HBV-DNA,随着精子进入卵细胞,尽管母亲本身无 HBV 感染,但被感染的受精卵在形成胚胎的过程中,HBV 也在不断增殖,使胎儿成为 CHB 患者或 HBV 携带者,因此这种传播方式是真正意义上的 FIVT。此外,即使受精时无 HBV 感染,但只要孕期夫妇生活在一起,孕妇仍一直未脱离被丈夫感染 HBV 的危险,因为日常生活的密切接触、孕期的性生活等均有可能使孕妇感染 HBV,进而又可通过父-母-婴的方式传播给子代,这其实是一种间接 FIVT,本质上是夫妻接触传播和 MIVT 连续的结果。

研究^[9]表明,HBV 可通过精子进入早期胚胎并进行增殖,这可能是 FIVT 的主要渠道。HBV 可经多种渠道传播,垂直传播是其主要传播途径,其中又以产前传播为主。产前传播可分为经胎盘传播和经生殖细胞传播。临床上使用高效免疫球蛋白联合乙肝疫苗阻断携带 HBV 的妊娠妇女及其新生儿间的传播,但有部分患者免疫失败。近年研究^[10]证实,HBV-DNA 可以游离或整合的形式以人生殖细胞为载体实现病毒的垂直传播。已证实,妊娠妇女血清 HBV-DNA 含量、病毒变异体和遗传易感性等是引起垂直传播阻断失败的因素,即病毒垂直传播的易感因素^[3]。因此,HBV 男性感染者既可通过生殖细胞将病毒垂直传播给子代,也可经接触感染其配偶并继而由配偶再垂直传播给子代。我国 HBV 携带率很高,而垂直传播在 HBV 代代相传的恶性循环中起重要作用,但长期以来 FIVT 被 MIVT 与家庭内部接触传播所掩盖,未受到足够重视^[11]。

研究^[12]显示,HBsAg 携带者的配偶中,HBsAg 阳性率为 13.21%,而 HBsAg 阴性人群的配偶阳性率仅为 6.29%,差异有统计学意义($\chi^2=4.23, P<0.05$)。说明夫妻双方中有一方为 HBV 感染者,则另一方被感染的可能性很大,若为孕妇,则胎儿亦可被感染。最新的研究^[13]表明,HBV 阳性的父亲可以将 HBV 垂直传播给胎儿引起宫内感染,父亲处于感染“窗口期”时,宫内感染更容易发生。

2.3 FIVT 的预防 对配偶为 HBV 携带者的孕妇在孕前或孕期接种乙肝疫苗;对孕妇也为 HBV 携带者或孕妇在孕末期前检验血中 HBsAb 尚未达到高滴度保护水平,选择在孕末期肌肉注射较大剂量高效免疫球蛋白的措施可基本阻断 FIVT^[14]。另外,HBsAg 阳性的男性在计划受孕前降低其血液

及精液中 HBV-DNA 水平为阻断 FIVT 的关键。有研究^[15]表明,HBV FIVT 高风险阈值为 $HBV-DNA \geq 1.0 \times 10^6$ copies/mL,经干扰素治疗后,FIVT 风险下降 31.87%。

3 HBV 相关标志物检测的应用及临床价值

3.1 乙型肝炎血清学标志物 (serological markers of hepatitis B, HBV-M) HBV-M 是目前临床上诊断、治疗和判断 HBV 感染者的病程和传染性的重要指标之一,主要反映人体对 HBV 的免疫反应状态,但不能直观地反映 HBV 在患者体内的复制情况^[16]。CHB 孕妇所生的新生儿脐带血和静脉血中的 HBV-M 水平具有良好的一致性,因此可以以脐带血的 HBV 标志物水平反映新生儿静脉血 HBV 水平^[17]。免疫成功的婴儿其 HBV-M 可有多种模式,不同的 HBV-M 往往具有特殊的临床意义^[18]。对行父(母)婴阻断的婴儿 HBV-M 的研究有助于加深对 HBV MIVT/FIVT 的生物学特点和感染发病机制的认识,提高 MIVT/FIVT 的诊断和防治水平。

3.1.1 HBV 定性检测 HBV 是一种双链 DNA 病毒,其抗原结构复杂,实验室常用 ELISA 法检测 HBV-Dane 颗粒的抗原及相应的抗体成分,以间接说明 HBV 在人体的存在情况,但该方法灵敏度有限,且存在一定的假阴性率。但随着临床医学的发展,定性检测已远远不能满足临床和患者的需要。

3.1.2 HBV 定量检测 HBV-M 是 HBV 临床诊断和治疗的重要依据,其中 HBeAg 是病毒复制的标志。近年来,有部分 HBeAg 阴性的患者肝炎活动明显,甚至发展为肝硬化,这部分患者的 HBV-DNA 呈阳性。有研究^[19]表明,1561 例 HBeAg 阳性者中,91.0%为 HBV-DNA 阳性。然而,在 6878 例 HBeAg 阴性者中,只有 45.4%的患者呈 HBV-DNA 阳性,HBeAg 阳性率与 HBV-DNA 表达的不同程度有着显著的不同。HBsAg 伴 HBV-DNA 双阳性的孕妇 HBV 母婴阻断成功与否与孕妇 HBV-DNA 载量水平有关,对 HBsAg 及 HBV-DNA 阳性的孕妇在产前给予多次注射乙型肝炎免疫球蛋白,可以有效降低胎儿宫内 HBV 感染的发生率^[20,21]。Logistic 回归分析^[22]表明,新生儿经严格的主-被动联合免疫后,影响阻断 HBV MIVT 的两个独立危险因素为孕妇血清 HBeAg 阳性和 $HBV-DNA \geq 1.0 \times 10^7$ copies/mL。由此可见,临床仅根据 HBV 血清标志物抗原抗体的检测来判断患者的传染性是不全面的,应重视 HBsAg 阴性的低水平 HBV 复制患者,结合 HBV-DNA 的检测结果进行综合判断,及早进行预防接种,阻断 HBV MIVT,以免造成宫内 HBV 感染。检测母亲及胎儿血清 HBV-DNA 含量,可评估 HBV 阳性孕妇的胎儿发生宫内感染危险性的高低,并针对高危人群采取适当措施,降低宫内感染的发生率。

HBV-DNA 定量检测是目前证实机体处于 HBV 感染状况最敏感的可靠指标,也是选择抗病毒治疗及评价药物疗效的指标之一。胎儿感染 HBV 与羊水、胎盘中的病毒相平行;

HBV 在宫内可感染胎儿血液、肝脏、肺脏等组织;羊水检测 HBV-M 及 HBV-DNA 可作为胎儿早期 HBV 感染的诊断依据之一^[17]。

目前,比较常见的 HBV 定量检测技术为电化学发光免疫分析技术(electro-chemiluminescence immunoassay, ECLIA)和实时荧光定量 PCR (real time quantitative polymerase chain reaction, RT-PCR)技术。ECLIA 自动化程度高、检测范围宽。该检测方法较酶免疫测定法 (enzyme immune assay, EIA)敏感,可定量检测,对评估 HBV 低水平感染及潜伏期感染、HBV 疫苗接种效果以及抗病毒治疗疗效判断具有重要的临床意义。应用 ECLIA 法检测 HBsAg 检测范围为 0.05~6250.00 ng/mL,而 EIA 法测定 HBsAg 检测范围仅为 6.1~390.0 ng/mL。相较于 EIA, ECLIA 检测 HBsAg 的灵敏度高,重复性好,检测范围宽,且能够定量检测 HBV-M,不仅避免了窗口期 HBV-M 低浓度时 ELISA 检测呈假阴性的不足,而且也使早期发现病情和随时监测病情成为可能,并且能够有效的指导阻断 HBV 垂直传播,使 FIVT 阻断获得成功。今天,自动化化学发光免疫分析仪被广泛用于病毒学诊断,RT-PCR 技术提供了高灵敏度和宽广的动态核酸扩增范围,已逐渐取代其他指标量化和检测技术。

隐匿性 HBV 感染(occult hepatitis B virus infection, OBI)是指除血清转换前的窗口期外,机体存在 HBV-DNA,但无法检测到 HBsAg 阳性的 HBV 感染,可伴有或不伴有抗-HBcAb 或抗-HBsAb 阴性^[23]。这是一种特殊形式的 HBV 感染,可通过输血、器官移植等传播 HBV,并与慢性肝病、肝硬化的发生发展及治疗有关,具有重要的公共卫生学意义。近年来,由于 RT-PCR 技术的广泛使用,OBI 的存在得到广泛的证明。OBI 与抗-HBsAb 阴性或抗-HBsAb 低水平,或孕产妇高病毒载量和逃避突变的 S 基因有关^[24]。因此,加强孕妇 OBI 水平筛查、及时阻断 HBV MIVT/FIVT 是能否达到优生优育,造福后代之目的的关键。RT-PCR 技术检测新鲜血清和脐带血 HBV-DNA 载量,遵从循证医学的科学性,能够客观地评估新生儿宫内感染的情况。但此法需要特殊设备,检测程序复杂,而且实验室要求比较高,目前,难以在基层医院推广使用。

3.2 共价、闭合、环状 DNA 分子 (covalently closed circular DNA, cccDNA) cccDNA 转录活性是 HBV 复制水平的一种反映,这是一个重要标志,不仅提示活动性 HBV 感染,还可以监测临床治疗效果和评估预后。HBV cccDNA 的存在是 HBV 持续感染的关键。cccDNA 是 HBV 前基因组 RNA 复制的原始模板,虽然其含量较少,每个肝细胞内只有约 5~50 个拷贝,但对 HBV 的复制以及感染状态的建立具有十分重要的意义,只有清除了细胞核内的 cccDNA,才能彻底消除 HBV 携带状态,是抗病毒治疗的目标。目前,对 cccDNA 的认识及研究尚处于起步阶段,在检测技术上有许多问题需要解决,

比如,如何进一步提高灵敏度,如何避免松弛环状的双链 DNA 分子同时被扩增(国内有些文献报告的结果可能忽视了这一问题),如何简化操作步骤,从而能够被广泛应用等。检测或监测 cccDNA 的临床意义也有待挖掘,比如,可以通过细胞和动物模型来评判新药的抗病毒作用等。新近研究^[25]表明,HBV 用核苷(酸)类似物治疗可诱导产生不成熟的病毒颗粒,使 CHB 患者血清中出现 HBV-RNA,HBV-RNA 的出现与 HBV 的复制活性有关,浓度越高,出现耐药的可能性越大,另外,血清 HBV-RNA 浓度可以帮助临床判断核苷(酸)类似物治疗的停药时机。监测血清 HBV-DNA 或 HBV-RNA 水平可能在预测核苷(酸)类似物治疗 CHB 患者停药后重新激活的一个有用的方法。

4 小结

MIVT 作为 HBV 垂直感染的重要传播途径已得到了证实,并已有较好的预防措施。然而,男性慢性 HBV 感染对精子、体外受精和胚胎移植治疗的影响国内外报道目前均很少。人工授精时精液中的 HBV 能否感染女方、含有或整合有 HBV-DNA 的精子在体外受精和胚胎移植过程中对受精、胚胎着床、胚胎发育的可能影响等都应引起生殖医学领域的高度重视。长期以来 FIVT 被 MIVT 与家庭内部接触传播所掩盖,未受到足够重视。FIVT 也可导致胎儿感染 HBV,加强宣传教育、婚前进行乙肝筛查、选择最佳受孕时间、孕期定期注射乙肝免疫球蛋白、新生儿及时进行免疫注射等措施都可有效阻断 HBV FIVT。

5 参考文献

- 1 郝言. 慢性乙型肝炎的垂直传播阻断研究进展. 中国医药, 2013, 8: 427-428.
- 2 刘顺庆, 高月求. HBeAg 阴性慢性乙型肝炎研究现状. 肝脏, 2012, 17: 429-432.
- 3 周旭平, 朱依敏. 乙型肝炎病毒垂直传播机制及其易感因素. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29: 295-297, 311.
- 4 Kao JH, Chen DS. Global control of hepatitis B virus infection. Lancet Infect Dis, 2002, 2: 395-403.
- 5 张俊明, 李国敏, 洪宝林, 等. 预防免疫阻断乙型肝炎病毒父婴传播的临床研究. 实用临床医药杂志, 2009, 13: 134-135.
- 6 朱科伦, 朱郁炯, 曾文钰, 等. HBV 经生殖细胞传播的研究. 广州医药, 2008, 39: 3-5.
- 7 陈顺华, 张荣莲, 任坤海, 等. 父亲精液 HBVDNA 载量与 HBV 父婴垂直传播的相关性分析. 暨南大学学报(自然科学与医学版), 2014, 35: 372-376.
- 8 张荣莲, 罗颖, 谢婧娴, 等. HBV 父婴垂直传播水平与 HBVDNA 载量的相关研究. 中华流行病学杂志, 2010, 31: 159-162.
- 9 Ye F, Lin SM, Jin Y, et al. Relationship between the expression of HBV mRNA in embryos and father-to-infant HBV transmission.

- Zhonghua Nan Ke Xue, 2013, 19:429-433.
- 10 周旭平, 朱依敏. 乙型肝炎病毒垂直传播机制及其易感因素. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2010, 29:295-297.
- 11 夏良斌, 敖良飞, 杨菁, 等. 不同方案阻断乙型肝炎病毒父婴垂直传播的初步研究. 实用医学杂志, 2010, 26:583-585.
- 12 Sun AW, Bi SL, Wang F, et al. Study on the risk of HBV infection among spouses of HBsAg carriers. Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi, 2013, 34:214-217.
- 13 何进球, 袁松华, 冼革坚, 等. HBV 阳性父-婴垂直传播的临床研究. 实用妇产科杂志, 2005, 21:301-303.
- 14 陈红, 李小鸥, 雷艳喆. 阻断乙型肝炎病毒父婴传播的研究. 中国优生与遗传杂志, 2009, 17:80-81.
- 15 何伟锋, 甘爱华, 张晓慧, 等. 干扰素阻断乙型肝炎病毒父婴传播临床研究. 中国医药导报, 2013, 10:43-44, 47.
- 16 王金侠, 韩映雪, 唱丽敏, 等. HBVDNA 定量检测在乙型肝炎母婴传播中的应用价值. 临床荟萃, 2008, 23:272.
- 17 易为, 张禄雪, 胡玉红, 等. 新生儿静脉血与脐带血及孕妇静脉血 HBV 病原学标记物相关性研究. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27:173-176.
- 18 韩国荣, 余敏敏, 唐讯, 等. HBsAg 阳性孕妇的婴儿经宫内阻断治疗后 HBV 标志物模式及意义. 中华流行病学杂志, 2005, 4:244-245.
- 19 Chen P, Yu C, Wu W, et al. Serological profile among HBsAg-positive infections in southeast China: a community-based study. Hepat Mon, 2013, 13:e7604.
- 20 陈志英, 王丽芳, 张永茂, 等. 乙型肝炎疫苗联合乙型肝炎免疫球蛋白阻断 HBV 母婴传播的效果观察. 河北医药, 2013, 35:1326-1327.
- 21 王建芳, 唐讯, 王建玲. 孕妇及其新生儿 HBV 标志物与胎儿宫内感染的关系. 现代医学, 2007, 35:309-311.
- 22 Yin YZ, Zhou J, Zhang PZ, et al. Identification of risk factors related to the failure of immunization to interrupt hepatitis B virus perinatal transmission. Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi, 2013, 21:105-110.
- 23 Caviglia GP, Abate ML, Manzini P, et al. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C treated with antiviral therapy. Hepat Mon, 2012, 12:e7292.
- 24 Su H, Zhang Y, Xu D, et al. Occult hepatitis B virus infection in anti-HBs-positive infants born to HBsAg-positive mothers in China. PLoS One, 2013, 8:e70768.
- 25 Tsuge M, Murakami E, Imamura M, et al. Serum HBV RNA and HBeAg are useful markers for the safe discontinuation of nucleotide analogue treatments in chronic hepatitis B patients. J Gastroenterol, 2013, 48:1188-1204.

(收稿日期:2014-05-30)

(本文编辑:李霖)

第十五届国际眼科学学术会议

由上海市医学会眼科分会、全国十一省医学会眼科分会、复旦大学附属眼耳鼻喉科医院、温州医科大学眼视光学院共同主办;复旦大学附属眼耳鼻喉科医院、上海瑞欧展览服务有限公司承办的“第十五届国际眼科学学术会议”和“第十五届国际视光学学术会议”将于 2015 年 3 月 26 日-29 日在上海跨国采购会展中心举行。

来自中国、美国、亚欧部分国家的眼科学领域和视光学领域的医生、专家、学者和知名厂商将云集上海出席本届会议。注册本届会议并符合相关要求的参会代表可获得国家级 I 类继续教育学分 8 分, 参加眼科继续教育学习班者可获得国家级 I 类继续教育学分 10 分。同期将举行“第二届国际角膜塑形学术论坛”, 欢迎国内外医生踊跃投稿、注册参会。

1 投稿须知

论文投稿截止日期为 2015 年 2 月 20 日。论文投稿只需论文摘要。

摘要要求:①500 字以内的规范格式书写;②四段式基本形式(包括目的、方法、结果、结论);③投稿方式:在线上传。

2 会议时间与地点

会议时间:2015 年 3 月 26 日-29 日

会议地点:上海跨国采购会展中心(上海市普陀区中江路 35 号)

3 联系方式

大会秘书处:上海瑞欧展览服务有限公司

联系人:黄嘉菲、汤雅萍

地址:上海市中山北路 2790 号 1007 室

邮编:200063

电话:021-52665618

传真:021-52668178

大会网站:www.cooc.org.cn