

• 临床检验研究 •

荧光定量 PCR 检测婴幼儿巨细胞病毒感染情况分析

李 云, 王惠萱¹, 姜昌丽¹, 范泉水^{2△}

(1. 中国人民解放军成都军区昆明总医院检验科, 昆明 650032; 2. 中国人民解放军成都军区疾病预防控制中心军事医学研究所, 昆明 650032)

摘要:目的 探讨荧光定量 PCR(FQ-PCR)方法检测婴幼儿尿液人巨细胞病毒(HCMV)在 HCMV 感染诊断中的意义。方法 采用 FQ-PCR 检测 148 例临床疑似 HCMV 感染婴幼儿尿液中 HCMV-DNA 水平。同时采用 ELISA 法检测婴幼儿血清 HCMV-IgM 抗体。在尿液 HCMV-DNA 检测阳性患儿中比较血清 HCMV-IgM 抗体阳性与阴性患儿尿液中 HCMV-DNA 拷贝数差异。结果 FQ-PCR 检测尿液 HCMV-DNA 的阳性率为 35.14%, ELISA 检测婴幼儿血清 HCMV-IgM 的阳性率为 15.54%。两种方法对 HCMV 感染诊断的阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$)。在尿液 HCMV-DNA 检测阳性患儿中, IgM 抗体阳性组尿液 HCMV-DNA 拷贝数显著高于阴性组($P < 0.01$)。结论 FQ-PCR 检测尿液 HCMV-DNA 是早期诊断婴幼儿 HCMV 感染的敏感有效的方法。

关键词:巨细胞病毒; 聚合酶链反应; 婴儿; 感染

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.16.026

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)16-1841-02

Detection of human cytomegalovirus infection in infants by fluorescent quantitative PCR

Li Yun¹, Wang Hui-xuan¹, Jiang Changli¹, Fan Quanshui^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Kunming General Hospital of PLA, Kunming, Yunnan 650032, China;

2. Military Medical Institute, Center for Control and Prevention of Diseases of Chengdu Military Command, Kunming, Yunnan 650032, China)

Abstract: Objective To explore the clinical significance of fluorescent quantitative PCR(FQ-PCR) detection of human cytomegalovirus(HCMV) in urine of infants for the diagnosis of HCMV infection. **Methods** HCMV in urine of infants with suspect diagnosis of HCMV infection was detected by FQ-PCR and anti-HCMV IgM antibody(HCMV-IgM) in serum was also detected by ELISA. Of infants positive with HCMV-DNA in urine, levels of HCMV-DNA was compared between infants positive or negative with HCMV-IgM. **Results** The positive rate of FQ-PCR was 35.14%, that of ELISA was 15.54%, and there was significant different of positive rate between the two assays ($P < 0.01$). In infants positive with HCMV-DNA, quantitative levels of HCMV-DNA in urine of infants positive with HCMV-IgM were significantly higher than those negative with HCMV-IgM ($P < 0.01$). **Conclusion** FQ-PCR could be a sensitive assay for early diagnosis of HCMV infection in infants.

Key words: cytomegalovirus; polymerase chain reaction; infants; infection

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染是中国小儿中最常见的感染性疾病。先天性 HCMV 感染可累及患儿身体的各个组织,如造血系统、呼吸系统、中枢神经系统、消化系统、泌尿系统等,是引起先天性畸形的重要原因之一^[1]。据统计,在欧美新生儿 HCMV 先天性感染率为 0.2%~2.2%,其中出生时即有症状者占 10%~15%,无症状的感染婴儿中有 10%~15% 遗留后遗症,如智力迟缓、耳聋和视力损害^[2],因而早期诊断、早期治疗对预后至关重要。因 HCMV 感染临床症状无特异性,且存在潜伏性感染,故要确诊 HCMV 感染主要依靠实验室检查。本文同时用酶联免疫吸附试验(ELISA)和荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)分别对来本院就医的儿科患者的血液样本和尿液进行平行检测比较,旨在探讨 FQ-PCR 法检测尿 HCMV-DNA 的诊断意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2007 年 9 月至 2010 年 8 月本院确诊及高度怀疑为活动性 HCMV 感染的患儿 148 例,年龄两个月至 8 岁,其中男 95 例,女 53 例。诊断标准参考 1999 年中华医学会儿科学分会制定的 HCMV 感染诊断方案^[3]。当患儿出现与 HCMV 感染相关的症状、体征时,诊断为症状性感染;当患

儿无相关症状,无或有受损器官的体征和(或)实验室检查异常,诊断为无症状性感染。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 在患儿家属知情同意的情况下,采集被检者静脉血 2 mL,同时留取患儿新鲜晨尿 2 mL 于无菌干燥管中。

1.2.2 尿 HCMV-DNA 检测 采用 FQ-PCR 法,试剂盒由广州达安基因诊断有限公司提供,选用 HCMV 株(即人疱疹病毒 5 型)-AD169 基因组中编码即刻早期转录调节蛋白的 *IE1* 基因的一高度保守的非编码区为扩增靶区域,设计特异性引物及荧光探针,扩增片段长度为 86 bp。取患者晨尿 1 mL,12 000 r/min 离心 10 min 后弃上清液,沉淀中加入 DNA 提取液 50 μ L 充分混匀,100 $^{\circ}$ C 恒温处理(10 \pm 1)min,12 000 r/min 离心 5 min。将上清液 5 μ L 加入反应管,8 000 r/min 离心数秒,放入 DA7600 荧光定量 PCR 仪扩增。扩增条件为 93 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,10 个循环,93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,30 个循环。每次试验按试剂盒提供的定量阳性标准品做标准曲线,同时设置阴性、空白对照。反应结束后采用电脑自动分析计算定量结果,结果以 copy/mL 表示。

1.2.3 HCMV-IgM 检测 ELISA 试剂盒由美国 Bio-check

△ 通讯作者, E-mail: fqs168@126.com。

公司提供,按说明书进行操作并判断结果。

1.3 统计学处理 采用 SPSS 11.0 统计软件进行数据处理,计量资料组间比较采用 *t* 检验,计数资料比较采用 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 148 例患儿尿液和血液中 HCMV 检测情况 尿液 HCMV-DNA 定量检测阳性 52 例,阳性率为 35.14%。血清中 HCMV-IgM 检测阳性 23 例,阳性率为 15.54%。两项检测均阳性 22 例,均阴性 95 例,二者对 HCMV 感染诊断的一致率为 79.05%。FQ-PCR 法检测尿液 HCMV-DNA 的阳性率显著高于 ELISA 法检测血清 HCMV-IgM 的阳性率,差异有统计学意义($P < 0.01$),见表 1。

表 1 HCMV-DNA 和 HCMV-IgM 检测结果比较(n)

HCMV-IgM 检测结果	HCMV-DNA 阳性	HCMV-DNA 阴性	合计
HCMV-IgM 阳性	22	1	23
HCMV-IgM 阴性	30	95	125
合计	52	96	148

2.2 尿液 HCMV-DNA 检测阳性患儿血清 HCMV-IgM 阳性和阴性两组 DNA 拷贝数比较 根据血清 HCMV-IgM 抗体结果,将 FQ-PCR 法检测尿液 HCMV-DNA 阳性的 52 例患儿分为 IgM 阳性组(22 例)与阴性组(30 例)。IgM 阳性组尿液 HCMV-DNA 拷贝数为 $5.81 \times 10^3 \sim 2.54 \times 10^6$ copy/mL,均值为 3.15×10^5 copy/mL; IgM 阴性组尿液 HCMV-DNA 拷贝数为 $2.05 \times 10^3 \sim 6.21 \times 10^4$ copy/mL,均值为 8.61×10^3 copy/mL。两组患儿尿液 HCMV-DNA 的平均数拷贝数差异具有统计学意义($P < 0.01$)。

3 讨 论

HCMV 属疱疹病毒科 β 亚科,为双链 DNA 病毒,直径约 180~250 nm,是导致小儿先天畸形、智力低下、发育迟缓等病变的重要病原体^[4]。HCMV 感染在中国流行广泛,胎儿及免疫力低下的小儿易受侵害,临床表现与年龄有关,年龄大者感染 HCMV 后临床症状轻,可表现为无症状性感染;胎儿期和围生期发生的 HCMV 感染临床症状较重,表现复杂,可造成先天性脑白质发育不良,某些病例预后差,有致残、致死的可能^[5-6]。随着特异性抗 HCMV 药物更昔洛韦的应用,早期、快速而准确地诊断 HCMV 感染成为监测 HCMV 感染状态、给予合理的治疗及判断疗效、预后的关键。

经典的检测 HCMV 方法是病毒的分离,但病毒分离需要时间长,条件要求高,影响因素多,不适宜在一般临床实验室开展此项工作,并且病毒分离敏感性较差。ELISA 是应用最多的检测技术之一, HCMV-IgM 一直被作为活动性 HCMV 感染的诊断指标,其在感染后 3~5 d 出现,可持续 3~6 个月,多代表近期活动性感染; IgM 阴性可能是由于感染最初阶段,抗体尚未出现,或感染后抗体已经消失^[7-8]。同时, IgM 阳性不是原发感染的可信指标,不能作为诊断 HCMV 的直接证据,因为风湿因子、既往感染的残留和疱疹病毒属交叉反应均能造成假阳性。而 FQ-PCR 能快速定量检测 HCMV-DNA,它根据基因扩增量的多少来判断病情和预后评价,直接反映病原体浓度是否受到药物的治疗而发生变化,从而为药物疗效观察提供直接依据,以供临床上对用药剂量、用药时间以及是否联合用药提供参考^[9-10]。本研究结果显示,148 例患儿中, FQ-PCR 法检测尿 HCMV-DNA 的阳性率为 35.14%,高于 ELISA 法检测 IgM 的阳性率 15.54% ($P < 0.01$)。表明婴幼儿血清 HCMV-

IgM 检测对诊断 HCMV 感染有一定的局限性,尿液中高浓度 HCMV-DNA 的检出可以有效显示体内病毒的活跃程度,灵敏性更高。研究指出, FQ-PCR 法能更早检测到病毒感染,甚至比出现临床症状的时间提前 3~10 d^[11]。因此, FQ-PCR 检测 HCMV-DNA 对于临床 HCMV 感染的诊断和疗效监测有一定意义,而且对 HCMV-DNA 的检测将是 HCMV 感染诊断进行标准化和优化的发展方向。

HCMV 最易侵犯管道上皮细胞,尤其是肾脏及肝胆系统^[12]。HCMV 在肾小球和肾小管上皮细胞内复制,经尿液排出,因此可在尿液中检测到 HCMV-DNA,阳性检出率高,敏感性好。而由于新生儿体内免疫系统尚不成熟,产生 IgM 能力较弱,故血清 HCMV-IgM 的敏感性相对较差,即便血清 HCMV-IgM 阴性者也不能完全排除 HCMV 感染^[13]。对于婴幼儿患者,把尿液作为临床检测的标本,更具有无创性、简便的优点,易于被家属接受。而且尿液较血液更易收集,有利于在药物治疗及随访过程中收集标本,进行连续监测。尿 HCMV-DNA 的检测已被证实可以帮助判断婴幼儿 HCMV 感染,检测尿中 HCMV-DNA,可知其复制、排毒情况^[14],且其阳性检出率比血要高,假阴性率比血低得多,因此,采用尿标本既方便,阳性率又高。

不同方法、不同标本来源的检测结果代表不同的临床意义。HCMV-IgM 阳性表明 HCMV 活动或近期感染,但婴幼儿尤其是新生儿免疫反应较弱,可呈假阴性; HCMV-DNA 是病毒复制指标,可能是活动性感染或潜伏感染。HCMV-IgM 及 HCMV-DNA 均阳性,既是发病早期又是活动产毒期,说明大量病毒在体内活动应积极治疗。FQ-PCR 法阳性而 ELISA 法阴性者,考虑其为发病早期,是由于血清中 HCMV-IgM 尚未出现,而 FQ-PCR 检测法可检出极其微量的病毒 DNA 所致。本研究中 52 例 PCR 阳性患者中有 30 例 HCMV-IgM 阴性,其 HCMV-DNA 平均拷贝数低于 22 例 HCMV-IgM 阳性患者的 HCMV-DNA 平均拷贝数,两者差异具有统计学意义 ($P < 0.01$)。另有 1 例患儿 FQ-PCR 法检测为阴性,而 ELISA 法检测为阳性,可能是由于患儿处于恢复期,经抗病毒药物治疗后,体内已不存在病毒复制,但血清中仍留有 HCMV-IgM。因此笔者认为 FQ-PCR 法对于 HCMV 感染的早期诊断和疗效判断,具有重要意义。

参考文献

- [1] Khare M, Sharland M, Manyonda I, et al. PCR to detect primary CMV infection in seronegative pregnant women[J]. J Virol Methods, 2004, 119(1): 31-35.
- [2] 闫淑娟, 陈平洋. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断研究进展[J]. 国外医学儿科学分册, 2005, 32(5): 284-287.
- [3] 中华医学会感染消化组. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(7): 441.
- [4] 曾而明, 洪涛, 袁贤瑞. 人类巨细胞病毒与胶质瘤的关系[J]. 国际肿瘤学杂志, 2009, 36(1): 9-12.
- [5] 吴旗, 虞涛. PCR 法与荧光定量 PCR 法在人巨细胞病毒检测中的作用比较[J]. 中华中医学杂志, 2006, 30(1): 11-16.
- [6] 万琼, 瞿富明, 郭国和, 等. 白血病异基因造血干细胞移植受者巨细胞病毒感染的检测及临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(8): 874-875.
- [7] 李易娟, 曾瑜, 庄思齐, 等. 不同实验方法在诊断和检测新生儿先天性巨细胞病毒感染中的临床研究[J]. 中华围产医学杂志, 2005, 8(3): 187-191.

表 1 两组患者 UTRF、UIgG、U α 1-M、UmALB 含量测定结果

组别	n	UTRF(mg/L)*	UIgG(mg/L)*	U α 1-M(mg/L)*	UmALB(mg/L)*
I	117	0.09(0.08~1.49)	0.35(0.30~4.72)	1.00(0.40~8.73)	0.61(0.21~24.80)
II	126	0.25(0.08~21.70) Δ	1.51(0.30~48.10) Δ	2.62(0.32~29.80) Δ	4.05(0.20~452.00) Δ
Z 值		-8.619	-8.268	-6.964	-8.182
P 值		0.00	0.00	0.00	0.00

*: 计量数据用[中位数(数据范围)]表示; Δ : $P < 0.01$, 与 I 组比较; -: 无数据。

3 讨 论

DM 患者由于长期高血糖, 其非酶糖酰化速率增加, 导致组织缺氧, 血液黏度增高; 同时内皮细胞释放内皮素和一氧化氮等血管活性物质使肾小球毛细血管张力变化, 引起肾血流动力学改变, 使肾小球处于高滤状态, 引起肾损伤^[5]; 早期发现肾损伤并尽早治疗, 可以预防或延缓 DN 进展至终末期肾病^[6], 为了减少由于 DM 并发 DN 而引起的 DM 患者死亡, 提高 DN 检测阳性率、早期诊断和治疗, 尤为重要。

UmALB 是 DN 早期高血压性肾损伤的灵敏指标。有学者认为 UmALB 检测对 DM 肾脏病变的早期诊断具有价值, 在 DM 患者的尿常规检查中, 一旦出现 UmALB 持续阳性, DN 的发展将无法逆转^[7]。表 1 结果显示: T2DM 肾病改变组 UmALB 的检测结果, 与 T2DM 无肾病改变组相比较, $P = 0.00$, 差异有统计学意义。特别是测定结果中位数、数据范围的增高改变最为明显, 说明 UmALB 对 DM 肾脏病变的早期诊断是一项灵敏的指标, 与陈中举等^[8]报道相符。

UTRF 是肾小球滤膜损伤的灵敏指标。有报道称, UTRF 较 UIgG、U α 1-M、UmALB 更早改变显著, 认为 UTRF 较 UIgG、U α 1-M、UmALB 更灵敏地反映 DM 早期肾损伤, 与贾丽霞和张红艳^[9]报道一致。说明 UTRF DN 的早期改变, 是一项更灵敏的指标。

UIgG 是低分子蛋白, 可反映肾小管间质损伤。表 1 结果显示: UIgG 测定结果的中位数、数据范围, 较 I 组尿微量蛋白 UIgG 的测定结果有明显增高改变($P = 0.00$)。本研究结果与报道一致^[3], 认为 UIgG 的测定可以应用于临床较早期监测 DM 病程发展, 有利于及早诊断治疗, 减少或延缓 DN 的发生。国内有报道表明, UIgG 水平显著增高, 可以作为早期 DN 的灵敏指标之一^[10]。

U α 1-M 可作为肾小管损伤监测、评估预后、观察病情变化的指标。表 1 结果显示: II 组 U α 1-M 的测定结果的中位数、数据范围, 较 I 组尿微量蛋白 U α 1-M 的测定结果有明显增高改变($P = 0.00$)。U α 1-M 对 DN 的诊断, 也是较好的指标, 与文献报道一致^[11]。当肾小管功能受损, U α 1-M 排出量增加, 并不随尿 pH 值改变而降低, 它是反映肾小管损伤的灵敏指标^[12]。

综上所述, T2DM 肾病改变组的 UTRF、UIgG、U α 1-M、UmALB 的测定结果, 单项检测结果较 2DM 无肾病改变组有明显升高, 差异有统计学意义($P = 0.00$)。本文结果显示: 采用 4 种尿微量蛋白 UTRF、UIgG、U α 1-M、UmALB 的多项联检, 可以有效提高 T2DM 肾病的检出率, 减少漏诊, 确定肾损伤程度, 以达到早期诊治的目的。

参考文献

- [1] 勾宗蓉, 吕建华, 许强, 等. 尿液转铁蛋白、微白蛋白及 α 1-微球蛋白联合检测在糖尿病肾损伤早期诊断中的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(10): 990-991.
- [2] 邢芳会, 王永岐. 尿液微量蛋白联合检测筛查早期肾损害[J]. 检验医学与临床, 2008, 5(16): 1006.
- [3] 沙玲, 牛华, 平竹仙. 尿四联的检测在 2 型糖尿病病程发展中的临床应用探讨[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(7): 729-730.
- [4] 虞艳芳, 张永红, 王砚. 尿蛋白四联测定对糖尿病肾病早期诊断的价值[J]. 云南医药杂志, 2006, 27(5): 451-453.
- [5] 杨延敏, 马占玺, 李建华, 等. 尿微量蛋白诊断糖尿病早期肾损伤及预后观察[J]. 江西医学检验杂志, 2001, 19(3): 166-167.
- [6] 李碧, 雷斌, 祝兴元. 联合检测尿微量蛋白诊断糖尿病早期肾损害的意义[J]. 检验医学与临床, 2009, 6(12): 970-971.
- [7] Parving HH, Andersen AR, Smidt UM, et al. Effect of antihypertensive treatment on kidney function in diabetic nephropathy[J]. Br Med J, 1987, 294(6585): 1443-1447.
- [8] 陈中举, 管青, 赵硕生. 尿微量蛋白对糖尿病及高血压病的检测意义[J]. 国际检验医学杂志, 2007, 28(2): 174-176.
- [9] 贾丽霞, 张红艳. 尿微量蛋白检测对 2 型糖尿病早期肾病的诊断意义[J]. 现代预防医学杂志, 2008, 35(12): 2296-2297.
- [10] 叶任高, 陆再英. 内科学[M]. 6 版. 北京: 人民出版社, 2005: 787-797.
- [11] 汤进明, 赵进良, 张小莉. 尿微量蛋白对监测 2 型糖尿病早期肾功能损害的价值[J]. 临床检验杂志, 2004, 22(6): 459.
- [12] 李春保, 王林辉, 梅小斌. 糖尿病性肾损害[M]. 上海: 第二军医大学出版社, 2005: 55-58.

(收稿日期: 2011-05-09)

(上接第 1842 页)

- [8] 杨方华, 张德纯. 定量 PCR 法检测人巨细胞病毒感染的研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2006, 27(4): 367-370.
- [9] Risatti GR, Callahan JD. Rapid detection of classical swine fever virus by a portable real-time reverse transcriptase PCR assay[J]. J Clin Microbiol, 2003, 41(1): 500-505.
- [10] 弭尚俊, 刘建民, 刘学亮, 等. 2 602 例人巨细胞病毒感染跟踪调查研究分析[J]. 中国优生与遗传杂志, 2001, 9(5): 67-69.
- [11] Weinberg A. Comparison of PCR antigenemia assay, and rapid blood culture for detection and prevention of cytomegalovirus disease after lung transplantation[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(2): 768-772.

- [12] 徐锦, 陈剑平, 丁韵珍, 等. 尿巨细胞病毒定量检测在巨细胞病毒感染诊断中的意义[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(10): 596-597.
- [13] 王焕玲, 邱志峰, 盛瑞媛, 等. 巨细胞病毒 50 例临床分析[J]. 中华内科杂志, 2004, 43(8): 600-603.
- [14] Kuypers J, Wright N, Ferrenberg J, et al. Comparison of real-time PCR assays with fluorescent-antibody assays for diagnosis of respiratory virus infections in children[J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(7): 2382-2388.

(收稿日期: 2011-05-09)