

• 论 著 •

尿 HCMV-DNA 检测在新生儿疾病中的应用价值*

钟瑞芬¹, 黎四平^{1△}, 梁丽云¹, 程庆秋², 黄慧萍¹, 胡勉裕¹, 陆小梅²

(1. 东莞市第八人民医院检验科, 广东东莞 523325; 2. 东莞市儿科研究所, 广东东莞 523325)

摘要:目的 通过比较不同疾病中的新生儿尿人巨细胞病毒 DNA(HCMV-DNA)与血 HCMV-IgM 抗体的结果, 评估尿 HCMV-DNA 在新生儿疾病中的应用价值。方法 采集 2013 年 1 月至 2014 年 12 月在该院新生儿科住院的 1 520 例婴幼儿的尿液进行 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测, 同时采集其血液采用化学发光方法检测 HCMV-IgM 抗体。结果 1 520 例婴幼儿中尿 HCMV-DNA 阳性者有 153 例, 阳性率为 10.07%, 血液标本中的 HCMV-IgM 阳性者仅有 4 例, 阳性率为 0.27%, 两者比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。1 520 例婴幼儿的疾病构成中, 诊断为肝炎综合征的 HCMV-DNA 阳性率为 82.6%, HCMV-IgM 阳性率为 3.85%。出现黄疸症状的 HCMV-DNA 阳性率为 8.95%, 肺部感染的 HCMV-DNA 阳性率 4.62%。各项疾病或症状的 HCMV-DNA 阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 在诊断婴幼儿 HCMV 的感染时, 尿 HCMV-DNA 检测比 HCMV-IgM 抗体更为优越, 尤其在肝炎综合征、新生儿黄疸、肺部感染中的应用价值更高。

关键词: 巨细胞病毒; 人巨细胞病毒脱氧核糖核酸; 新生儿; 尿

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2016.04.018

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2016)04-0475-03

Application value of the detection of HCMV-DNA in urine in the diseases of neonatus*

Zhong Rui fen¹, Li Siping^{1△}, Liang Liyun¹, Chen Qingqiu², Huang Huiping¹, Hu Mianyu¹, Lu Xiaomei²

(1. Department of Clinical Laboratory, NO. 8 Hospital of Dongguan City, Dongguan, Guangdong 523325, China;

2. Dongguan Institute of Pediatric, Dongguan, Guangdong 523325, China)

Abstract: Objective To evaluate the value of detecting HCMV-DNA in urine in the diseases of newborn babies, by comparing the result between HCMV-DNA in urine and HCMV-IgM antibody in blood in different diseases of the newborn babies. **Methods** The urine and blood samples were collected from 1 520 infants who were in hospital of the neonate department from January 2013 to December 2014. The HCMV-DNA in urine was examined by fluorescence quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR). And HCMV-IgM antibody in blood was examined by the method of chemiluminescence(ECL). **Results** In the 1 520 cases, 153 had detectable HCMV-DNA in their urine samples with a positive rate 10.07%, while only 4 cases were positive of the HCMV-IgM antibody in blood with a positive rate 0.27%. The two groups was statistically significant difference ($P < 0.05$). In the infant diseases of 1 520 cases, the positive rate of HCMV-DNA in urine was 82.6% of the hepatitis syndrome while the positive rate of HCMV-IgM antibody in blood was 3.85%. The positive rate of HCMV-DNA in urine was 8.95% in the jaundice symptoms, while the positive rate HCMV-DNA in urine was 4.62% in the pulmonary infection. Each group of disease was statistically significant difference in the positive rate of HCMV-DNA ($P < 0.05$). **Conclusion** The detection of HCMV-DNA in urine is more beneficial to the diagnosis of HCMV infection of infants than the detection of HCMV-IgM antibody in blood, especially in hepatitis syndrome, neonatal jaundice and pulmonary infection.

Key words: cytomegalovirus; human cytomegalovirus DNA; neonatus; urine

人巨细胞病毒(HCMV)属于 β 疱疹病毒亚科,是导致新生儿产后感染的常见病原微生物。HCMV在自然人群中的感染较为常见,通常呈无症状的隐性感染^[1]。当孕妇感染HCMV后,病毒可通过胎盘使胎儿感染,可导致流产、早产或者引起胎儿生长发育迟缓及畸形等,严重者还可导致死胎,严重威胁孕妇及胎儿的健康^[2]。受到HCMV感染的胎儿在出生后,可能出现黄疸、肝炎、皮肤出血点及淤斑或肺炎等症状,还可能会出现耳聋、运动或智力障碍等^[3],如果能对感染的婴儿进行早期的诊断将对婴儿的治疗有重要的指导意义。婴儿出生后,还可通过吸食含有HCMV的乳汁而被传染^[4]。本研究采用荧光定量PCR方法检测有黄疸或肝功能损害等症状的新生婴儿以及早产儿尿液中的HCMV-DNA,再用化学发光方法检测

其血液中HCMV-IgM抗体,比较这两种检测方法的检测阳性率,探讨HCMV-DNA荧光定量检测方法在HCMV感染引起不同的疾病或症状中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 1 520例婴幼儿来源于本院2013年1月至2014年12月在新生儿科住院的患儿,患儿入住新生儿科的原因有肝炎综合征,黄疸症状,肺部感染症状,早产儿等,其中男826例,女694例,年龄从1~15 d,平均年龄为7 d。

1.2 标本采集 婴幼儿尿标本的采集:清洁患儿外阴,用一次性洁净尿袋留取患儿新鲜尿液2~5 mL,置于干净的无菌管中,立即送检。标本送达实验室后置-20℃冰箱中保存,集中检测HCMV-DNA。患儿血液标本的采集:消毒皮肤后,用一

性采血管采集静脉血 2 mL, 立即送检。标本送达实验后立即检测或离心分离血清后置 2~8 °C 冰箱中保存, 第 2 天检测。

1.3 仪器与试剂 HCMV-DNA 采用中山大学达安基因股份有限公司提供的 HCMV 荧光 PCR 定量试剂, 检测仪器采用美国 MX3000P 实时荧光定量 PCR 仪对本标本进行检测。HCMV-IgM 采用深圳新产业化学发光仪及配套试剂进行检测。

1.4 HCMV-DNA 标本处理 取晨尿 1 mL 于 1.5 mL 的无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清, 沉淀(沉淀如不明显, 再加尿液 1 mL 于以上 1.5 mL 的无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 去上清)加 50 μL DNA 提取液混匀, 100 °C 恒温处理 10 min(误差不超过 1 min), 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液(含病毒 DNA)2 μL 做 PCR 扩增。另外取出阴性质控品加 50 μL DNA 提取液打匀, 100 °C 保温 10±1 min; 12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液 2 μL 备用。

1.5 PCR 扩增 从试剂盒中取出 HCMV PCR 反应管若干, 分别加入处理后的上清液各 2 μL, 8 000 r/min 离心数秒。93 °C : 2 min; 93 °C : 45 s, 55 °C : 60 s, 10 个循环; 93 °C : 30 s; 55 °C : 45 s, 30 个循环。

1.6 结果判断 阴性质控品: 增长的曲线不呈 S 型曲线或 Ct 值等于 30; 阳性质控品: 增长的曲线呈 S 型曲线, 且强阳性质控品检测值允许范围 $1.0 \times 10^5 \sim 2.0 \times 10^6$ copies/mL, 弱阳性质控品检测值允许范围 $1.0 \times 10^3 \sim 2.0 \times 10^4$ copies/mL; 阳性定量质控品: 增长的曲线呈 S 型曲线 Ct 值小于 27, 且 $0.97 \leq |r| \leq 1$ 。以上要求需在同一次实验中同时满足, 否则, 本次实验无效, 全部实验应重新进行。若定量数值在线性范围内: $5.0 \times 10^2 \leq C \leq 5.0 \times 10^8$, 则样品中的 HCMV-DNA 含量 = C copies/mL; 如果定量数值在线性范围外, 有两种情况: (1) $C > 5.0 \times 10^8$, 则样品中的 HCMV-DNA 的水平大于 5.0×10^8 copies/mL。如果需要精确定量结果, 可将样品稀释至线性范围内再检测。(2) $C < 5.0 \times 10^2$, 则样品中的 HCMV-DNA 水平小于 5.0×10^2 copies/mL。在本研究中, 为方便统计, 把样品中的 HCMV-DNA 水平大于或等于 5.0×10^2 copies/mL 判断为阳性, 把样品中的 HCMV-DNA 的水平小于 5.0×10^2 copies/mL 判断为阴性。

1.7 HCMV-IgM 标本处理及结果判断 血液标本及时分离血清, 避免溶血, 尽快采用深圳新产业化学发光仪进行检测, 若样品的检测结果小于 2.0 AU/mL 的为阴性, 若样品的检测结果大于或等于 4.2 AU/mL 的为阳性。

1.8 统计学处理 使用 SPSS17.0 统计软件对所有数据进行分析, 采用 χ^2 检验分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 两种 HCMV 方法的结果 1 520 例婴幼儿的尿液标本中, HCMV-DNA 阳性者有 153 例, 阳性率为 10.07%, HCMV-DNA 阳性者其水平介于 $1.037 \times 10^3 \sim 4.966 \times 10^6$ copies/mL。1 520 例婴幼儿血液标本中的 HCMV-IgM 阳性者有 4 例, 阳性率为 0.27%, HCMV-IgM 阳性者其抗体水平介于 5.6~11.2 AU/mL, 两者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 表明 HCMV-DNA 的阳性检出率较 HCMV-IgM 的阳性检出率高。见表 1。

2.2 HCMV 在不同疾病中的阳性率 1 520 例婴幼儿的疾病或症状构成中, 诊断为肝炎综合征的 HCMV-DNA 阳性率最高, HCMV-IgM 阳性率也最高, 出现黄疸症状的、肺部感染症

状 HCMV-DNA 阳性率也较高。各项疾病或症状的 HCMV-DNA 阳性率比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。表明在新生儿肝炎综合征、黄疸、肺部感染时, 应注意排除 HCMV 的感染。见表 2。

表 1 1 520 例婴幼儿的两种 HCMV 方法的结果比较 (n)

HCMV-IgM	HCMV-DNA		合计
	阳性	阴性	
阳性	4	0	4
阴性	149	1 367	1 516
合计	153	1 367	1 520

表 2 1 520 例婴幼儿的疾病或症状构成比及 HCMV 在其中的阳性率 [n(%)]

疾病或症状	n	HCMV-DNA	HCMV-IgM
肝炎综合征	52	43(82.69)	2(3.85)
黄疸	1 140	102(8.95)	1(0.09)
肺部感染	130	6(4.62)	1(0.77)
早产儿	76	1(1.32)	0(0.00)
其他	122	1(0.82)	0(0.00)

2.3 HCMV 感染的性别分布 1 520 例婴幼儿中的 HCMV 感染的性别分布中, 男性婴幼儿尿 HCMV-DNA 阳性者有 85 例, 阳性率为 10.29%, 血液 HCMV-IgM 阳性者有 2 例, 阳性率为 0.24%。女性婴幼儿尿 HCMV-DNA 阳性者有 68 例, 阳性率为 9.80%, 血液 HCMV-IgM 阳性者有 2 例, 阳性率为 0.29%, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。见表 3。

表 3 1 520 例婴幼儿中的 HCMV 感染的性别分布 [n(%)]

性别	n	HCMV-DNA	HCMV-IgM
男	826	85(10.29)	2(0.24)
女	694	68(9.80)	2(0.29)

3 讨 论

HCMV 在人群中感染较为普遍, 多表现为隐性感染, 当个体免疫力低下时, 病毒可表现较为活跃而出现症状, 成为显性感染^[1,5]。婴幼儿免疫系统发育尚不完全, 因此, 极易引起 HCMV 感染^[6], 并且婴幼儿产生 IgM、IgG 抗体的能力均较弱, 血清中 HCMV-IgM 抗体不强, 检出率较低^[7]。此外, HCMV 抗体的产生需一段时间, 当患者感染病原体约 2 周后 IgM 抗体才达到被检出的水平, 说明 IgM 检查不能作为早期诊断的良好指标。本研究中, HCMV-IgM 阳性者其抗体水平介于 5.6~11.2 AU/mL, 抗体水平均不高。最后, 从检测方法学上, 荧光定量 PCR 的准确性和快速性优势, 能更早检测到感染的病毒, 甚至比出现临床症状的时间提前 3~10 d^[8]。表 1 的结果显示, 1 520 例婴幼儿中 HCMV-DNA 的阳性率为 10.07%, 远远地高于血液标本中的 HCMV-IgM 的阳性率(仅为 0.27%)。表明在出生 15 d 内的婴幼儿中, HCMV-DNA 的阳性检出率较 HCMV-IgM 的阳性检出率要高, HCMV-DNA 在诊断婴幼儿 HCMV 感染中的价值较高。

HCMV 可以侵犯机体的多种器官, 肝脏是重要的靶器官,

在婴幼儿感染中可以造成黄疸、肝功能受损、肝脾肿大、肺炎、瘀斑等,还可表现为局限的感染,在孕妇感染中可导致流产、早产或者引起胎儿生长发育迟缓等^[3,9]。本研究表 2 的结果显示,在 1 520 例婴幼儿中,诊断为肝炎综合症的患儿中,HC-MV-DNA 阳性率最高,HCMV-IgM 阳性率也最高,出现黄疸症状的、肺部感染症状 HCMV-DNA 阳性率也较高,此时 HC-MV-IgM 未见阳性。表明 HCMV 更容易侵犯肝脏和肺部。表 3 的结果表明 HCMV 在婴幼儿感染中,与婴幼儿的性别无关。

综上所述,结合本研究的结果,由于 HCMV 具有嗜上皮细胞的特性,容易感染肾脏上皮细胞,在尿标本中容易检出 HCMV-DNA^[10],加上尿液标本取材方便、对新生儿无损伤性,更为家长所接受,因此,笔者认为进行尿 HCMV-DNA 检测比进行 HCMV-IgM 抗体检测来判断是否感染 HCMV 更具有快速、准确、可靠、便捷的优势。当新生儿出现肝炎综合征、黄疸症状、肺部感染症状等其他症状时,尤其是当出现肝功能受损排除乙肝、丙肝、甲肝、丁肝等肝炎病毒,以及肺部感染排除一般微生物、支衣原体、呼吸道病毒后,也应当提示临床进行尿 HCMV-DNA 检验以排除巨细胞感染的可能性,而不能只依靠 HCMV-IgM 抗体的检测结果来判断。至于是否在孕期也进行孕妇尿 HCMV-DNA 检测或者增加孕期 HCMV-IgM 检测频率来预测新生儿巨细胞感染,以及对于新生儿 HCMV-IgM 抗体阴性者经过 2 周至 1 个月的时间,其 HCMV-IgM 的阳性检出率是否会增加来辅助诊断新生儿巨细胞感染,还有待进一步调查研究。

(上接第 474 页)

大观霉素活性仍然最强,具有良好临床疗效,可以作为治疗淋病的优选药物,因此,加强淋球菌耐药性的长期监测非常重要。

参考文献

[1] 曹文苓,费实,武明昌,等. 广州地区淋球菌对抗生素耐药性测定结果[J]. 临床皮肤科杂志,1999,4(28):223-224.

[2] Cao WL, Liang JY, Li XD, et al. Trends in antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolated from Guangzhou, China, 2000 to 2005 and 2008 to 2013[J]. Sexually Transmitted Diseases, 2015, 42(1):27-29.

[3] 刁兴,郑和平,曹文苓,等. 1996~2001 年广州淋球菌耐药性和质粒介导耐药株流行趋势[J]. 中华皮肤科杂志,2002,35(6):467-469.

[4] Yang Y, Liao M, Gu WM, et al. Antimicrobial susceptibility and molecular determinants of quinolone resistance in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Shanghai[J]. J Antimicrob Chemother, 2006, 58(1):868-872.

[5] Su X, Jiang F. Surveillance of antimicrobial susceptibilities in *Neisseria gonorrhoeae* in Nanjing, China, 1999 - 2006[J]. Sex Transm Dis, 2007, 34(1):995-999.

[6] 曹文苓,黎小东,李嘉彦,等. 淋球菌对五种抗生素的耐药性连续六年监测结果分析[J]. 中华检验医学杂志,2004,27(1):761-763.

[7] Lee H, Hong SG, Soe Y, et al. Trends in antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolated from Korean patients from 2000

参考文献

[1] Syggelou A, Iacovidou N, Kloudas S, et al. Congenital cytomegalovirus infection[J]. Ann N Y Acad Sci, 2010, 120(2):144-147.

[2] 胡艳,陈黎,舒静,等. 婴儿巨细胞病毒性肝炎 88 例[J]. 实用儿科临床杂志,2009,24(19):1497.

[3] 尚世强,陶然. 儿童巨细胞病毒感染的诊断[J]. 实用儿科临床杂志,2006,21(22):1598-1600.

[4] Hamele M, Flanagan R, Loomis CA, et al. Severe morbidity and mortality with breast milk associated cytomegalovirus infection[J]. Pediatric Infect Dis J, 2012, 9(1):84-86.

[5] 吴碧林. 婴儿肝炎综合征 85 例病原学及临床分析[J]. 中华现代儿科学杂志,2007,4(3):228-229.

[6] 中华医学会儿科学分会感染消化学组,中华儿科杂志编委会. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志,1999,37(7):441.

[7] 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.

[8] 陈均亚,李素华,陈益平,等. 甲泼尼龙冲击治疗小儿麻疹并重症肺炎的临床观察[J]. 中国小儿急救医学,2006,13(6):520-521.

[9] 黄绮梨,朱锋,方仲文. 孕妇血清巨细胞病毒负电荷量与胎儿宫内感染研[J]. 检验医学与临床,2008,5(16):986-989.

[10] 缪美华,邵雪君,朱宏,等. 婴幼儿人巨细胞病毒感染 154 例 PCR 与 ELISA 检测比较[J]. 南通医学院学报,2009,29(6):447-448.

(收稿日期:2015-10-18)

to 2006[J]. Sex Transm Dis, 2011, 38(1):1082-1086.

[8] Martin I, Sawatzky P, Allen V, et al. Emergence and characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates with decreased susceptibilities to ceftriaxone and cefixime in Canada: 2001 - 2010[J]. Sex Transm Dis, 2012, 39(1):316-323.

[9] Dillon JR, Ruben M, Li H, et al. Challenges in the control of gonorrhea in South America and the Caribbean: monitoring the development of resistance to antibiotics[J]. Sex Transm Dis, 2006, 33(1):87-95.

[10] The WHO Western Pacific Gonococcal Antimicrobial Surveillance Programme. Surveillance of antibiotic resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the WHO Western Pacific Region, 2000[J]. Commun Dis Intell, 2001, 25(4):274-276.

[11] Bignell C, Fitz GM. UK national guideline for the management of gonorrhoea in adults[J]. STD AIDS, 2011, 22(10):541-547.

[12] Zhu BY, Yu RX, Yin Y, et al. Surveillance of antimicrobial susceptibilities of *Neisseria gonorrhoeae* in Nanning, China, 2000 to 2012[J]. Sex Transm Dis, 2014, 41(1):501-506.

[13] Unemo M, Nicholas RA. Emergence of multidrug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea[J]. Future Microbiol, 2012, 7(1):1401-1422.

[14] 钟娜,郑文爱,王芳乾,等. 2006~2011 年海南地区淋球菌耐药性监测分析[J]. 中国皮肤性病学杂志,2013,27(1):64-65.

(收稿日期:2015-10-28)