

• 检验技术与方法 •

荧光定量 PCR 快速检测婴儿中枢神经系统巨细胞病毒

刘 畅, 刘琳琳, 余鸽春, 罗福康[△]

(第三军医大学新桥医院检验科, 重庆 400037)

摘 要:目的 探讨荧光定量 PCR 技术快速诊断中枢神经系统损伤婴儿人巨细胞病毒(HCMV)感染的临床价值, 为婴儿 HCMV 先天性感染的快速特异性诊断提供实验依据。方法 分别用实时荧光定量 PCR 技术和 ELISA 法检测 84 例疑似先天性 HCMV 感染的中枢神经系统损伤婴儿中尿液 HCMV-DNA 及血清 HCMV-IgM。结果 84 例中枢神经损伤婴儿尿液中, 29 例 HCMV-DNA 阳性, 检出率为 34.5%。活动性 HCMV 感染病毒载量介于 $5.9 \times 10^5 \sim 7.6 \times 10^2$ copy/mL。HCMV-IgM 阳性 15 例, 检出率 17.8%。两种方法阳性检出率差异有统计学意义($\chi^2=6.87, P<0.01$)。结论 婴儿先天性 HCMV 感染是引起其中枢神经系统损伤的重要原因之一。在连续动态检测患儿 HCMV 多种指标时, 实时荧光定量 PCR 法可快速、特异地定量检测 HCMV-DNA, 有效反映体内 HCMV 的活动性感染, 在 HCMV 感染的快速诊断、疗效观察方面具有更好的临床应用价值。

关键词:聚合酶链反应; 中枢神经系统感染; 巨细胞病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.010

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1937-01

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属疱疹病毒科, 为双链线状 DNA 病毒, 可引起人类先天性或后天生感染, 儿童是易感人群, 特别是婴幼儿。婴儿先天性或获得性感染 HCMV 可引起婴儿肝炎综合征、生长发育受阻或中枢神经系统障碍等并发症。研究认为, 新生儿 HCMV 感染是导致神经系统损害的重要因素, HCMV 感染患儿神经系统功能损伤包括智力发育落后、脑瘫、神经性耳聋等^[1]。因此, 建立快速、灵敏且特异的检测技术, 以便临床及时给予抗病毒治疗, 对控制病情和降低患儿死亡率至关重要。笔者的因分别通过实时荧光定量 PCR 和酶联免疫吸附试验(ELISA)对本院收治疑似 HCMV 感染所引起的中枢神经系统疾病患儿的尿液及血液样本进行检测, 评价荧光定量 PCR 技术检测 HCMV 的应用价值, 为临床先天性 HCMV 感染的快速诊断提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集本院 2008 年 1 月至 2011 年 5 月疑似 HCMV 感染, 以中枢神经系统损伤为主要症状的患儿 84 例, 年龄 1 个月至 1 岁, 其中男 57 例, 女 27 例。

1.2 仪器与试剂 采用 RG3000 自动荧光 PCR 仪。荧光定量 PCR 试剂采用 HCMV 核酸检测试剂盒(ELISA)。血清 HCMV-IgM 检测采用康华生物 TORCH-IgM 5 项联合检测试剂。

1.3 方法

1.3.1 HCMV-DNA 测定 分别取 100 mL 患儿尿液样本, 按照 ELISA 检测试剂盒操作说明, 提取尿液样本核酸 DNA 进行实时荧光定量 PCR 检测。扩增条件为 37 ℃ 5 min; 94 ℃ 1 min, 95 ℃ 5 s, 60 ℃ 30 s, 40 个循环。每次实验以试剂盒提供的标准品、阴性对照和阳性质控进行标准曲线制备、阴性及阳性质控对照。反应结束后, 根据 Rotor-gen 6.0 软件分析计算定量结果。

1.3.2 HCMV-IgM 抗体测定 血清样本按 ELISA 试剂盒说明书进行 HCMV-IgM 抗体检测。

1.4 统计学处理 采用 SPSS 13.0 进行卡方检验, 以 $P<0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

以 HCMV-DNA 大于 1.00×10^3 copy/mL 为阳性标准, 84 例尿液标本中 29 例 HCMV-DNA 阳性, 检出率 34.5%。HCMV 感染病毒载量介于 $5.9 \times 10^5 \sim 7.6 \times 10^2$ copy/mL。84 例

患儿中, 血清 HCMV-IgM 阳性 15 例, 检出率 17.9%。对两种方法检出率进行统计学分析, 差异有统计学意义($\chi^2=6.87, P<0.01$)。结果见表 1。

表 1 HCMV 荧光定量 PCR 和 ELISA 抗体检测的阳性率比较[n 或 n(%)]

ELISA 抗体检测	PCR 阴性	PCR 阳性	合计
阴性	34	29	63(75.0)
阳性	15	6	21(25.0)
合计	49(58.3)	35(41.7)	84

两组相比, $P<0.01$ 。

3 讨 论

先天性 HCMV 感染是指母体内 HCMV 通过胎盘使胎儿在宫内受到感染, 可引起多系统、多器官损害。先天性 HCMV 感染可通过激活小胶质细胞、诱导神经细胞凋亡等多种途径使神经系统发育异常, 导致儿童出现先天性畸形、智力低下、发育迟缓等中枢神经系统疾病^[2-4]。神经干细胞、神经元及神经胶质细胞对 HCMV 普遍易感, 胎儿在感染 HCMV 后仅 10%~15% 有明显的症状, 其病死率在 1% 左右, 90% 以上婴儿呈隐性感染, 感染患儿则逐步出现迟发神经系统损伤^[5-6]。如何早期、快速而准确的诊断 HCMV 感染, 成为早期干预、综合治疗以减轻新生儿神经系统损害的关键^[7]。

目前, HCMV 感染的实验室诊断方法主要包括: 病毒分离培养、血清学检测、病毒抗原及 DNA 检测^[8]。病毒培养阳性是诊断 HCMV 感染的“金标准”, 但因该方法费时, 使其临床应用受限。血清学诊断主要用于 HCMV-IgM 抗体检测, HCMV-IgM 抗体阳性是近期活动性感染的诊断指标。但 HCMV-IgM 抗体产生具有窗口期、滞后性及时限性, 且 HCMV-IgM 抗体检测结果容易受到机体免疫状态的影响, 婴儿免疫系统发育不完善, 有可能导致 HCMV 感染检测假阴性。Bendiksen 等^[9]研究发现, 血清中 HCMV-IgM 水平与病毒复制无关, 不能作为早期诊断的良好指标。

荧光定量 PCR 检测技术是在常规 PCR 技术基础上, 结合 PCR 高灵敏性、DNA 杂交高特异性及光谱技术高精确定量为一体的快速检测技术, 能快速定量检测 HCMV DNA 复制情况, 提供病毒活动性感染的临床依据^[10]。(下转第 1941 页)

[△] 通讯作者, E-mail: luofukang2002@sina.com.

27.7 mmol/L。本线性实验结果显示:A 血糖仪在 1.7~25.8 mmol/L 血糖浓度范围内基本呈线性;B 血糖仪在 1.6~27.2 mmol/L 血糖浓度范围呈线性;C 血糖仪在 1.6~24.4 mmol/L 血糖浓度范围呈线性;D 血糖仪 1.4~26.0 mmol/L 血糖浓度范围呈线性;F、G 血糖仪分别在 1.3~20.5 mmol/L 和 1.7~25.4 mmol/L 范围内基本呈线性;E 血糖仪低值线性不够,在 2.4~24.96 mmol/L 范围内基本呈线性。B 款血糖仪线性良好,基本与说明书一致,其余各款均未达到说明书所给出的线性范围,因此,在日常工作中,当血糖浓度过高或过低时,均应结合生化仪检测结果进行综合分析。

7 款血糖仪毛细血管全血血糖与己糖激酶法(HK)静脉血浆血糖结果有良好的相关性($r^2>0.95$),成对 t 检验显示,A、C、E、F 血糖仪结果与生化仪结果无统计学意义($P>0.05$),而 B、D、G 3 款血糖仪结果与生化仪结果差异有统计学意义($P<0.05$),血糖仪测定值均高于生化仪,与文献报道不符^[7]。分析原因,主要是血液离体血细胞可不断从血浆中摄取葡萄糖,未及时分离血浆或血清即可明显影响检测结果,因此血液抽取后应及时测定。

通过测试,7 款血糖仪批内精密性其 CV% 均小于 10%,符合 NCCLS C30-A2 文件,但有 3 款血糖仪器的结果与生化分析仪的结果出现较大偏差。由于全血质控品难以保存,故定期进行快速血糖仪与全自动生化分析仪的测定值对比试验是提高快速血糖仪检测准确度的一种重要手段^[8]。

虽然快速血糖仪有简便、快速,不受场所限制等诸多优点,但由于其测定时间的影响因素较多,而且不同厂家,不同型号血糖仪检测结果存在差异^[9],给诊断、治疗带来影响。加上血糖仪还受测定范围限制^[10],过高或过低值不能准确显示。

(上接第 1937 页)

本研究结果显示,48 例疑似 HCMV 感染的中枢神经系统疾病患儿,尿液 HCMV-DNA 检出 29 例阳性,检出率 34.5%,血清 HCMV-IgM 检出 15 例阳性,检出率 17.8%,尿液 HCMV-DNA 阳性率高于血清 HCMV-IgM,两种方法比较差异具有统计学意义($P<0.01$)。新生儿感染 HCMV 后,由于病毒的嗜上皮特性,使其易感于肾脏细胞,定量检测尿液 HCMV-DNA,可有效反映 HCMV 复制情况,具有阳性率高的优点。同时,尿液在患儿标本收集过程中,具有无创性,较易采集,有利于在患儿药物治疗及随访过程中进行连续监测。因此,小儿尿液实时荧光定量 PCR 技术是目前快速检测 HCMV 感染的特异、灵敏的方法,在临床 HCMV 感染患儿的快速早期诊断、病毒活动性监测等方面具有较大的应用价值,可进一步协助临床对先天性 HCMV 感染患儿行神经系统功能的早期监测,有利于及时给予相应治疗从而改善患儿的预后。

参考文献

[1] Leung AK, Sauve RS, Davies HD. Congenital cytomegalovirus infection [J]. Natl Med Assoc, 2003, 95(3): 213-218.

[2] Nigro G, Adler SP, La Torre R, et al. Passive immunization during pregnancy for congenital cytomegalovirus infection [J]. N Engl J Med, 2005, 353(13): 1350-1362.

[3] Shibata Y, Kitajima N, Kawada J, et al. Association of cytomegalovirus with infantile hepatitis [J]. Microbiol Immunol, 2005, 49(8): 771-777.

[4] Dong G, Shang S, Liang L, et al. Determination of the six major

因此,快速血糖仪测定时应操作规范,血糖仪应定期校正并与生化仪比对分析,以使结果有较高的准确性。

参考文献

[1] 李华,沈学然.便携式血糖仪与生化分析仪测定血糖结果比对分析[J].中国误诊学杂志,2010,10(16):3837.

[2] 曾正莲,欧阳蓉. POCT 血糖仪的质量管理与意义[J].国际医学检验杂志,2010,31(4):404.

[3] 贺云骊,周方满.快速血糖仪与自动生化仪血糖测定结果比对分析[J].现代实用医学,2010,22(4):386-387.

[4] 冯仁丰.临床检验质量管理技术基础[M].2版.上海:上海科学技术文献出版社,2007:408.

[5] 井洪,白春洋,雷素萍.淮河医院快速血糖仪与全自动生化分析仪结果比较分析[J].中国误诊学杂志,2007,7(8):1723-1724.

[6] National Committee for Clinical Laboratory Standards. C30-A2 Point-of-care blood glucose testing in acute and chronic care facilities: approved guideline second edition[S]. Wayne, PA: NCCLS, 2002.

[7] 罗南英.快速血糖仪与全自动生化分析仪测定血糖的对比分析[J].实用医技杂志,2008,15(31):4333-4334.

[8] 欧阳蓉,曾正莲,谭云昌. POCT 血糖仪与全自动生化分析仪检验血糖的比较分析[J].国际检验医学杂志,2010,31(9):1020.

[9] 李素芝.快速血糖仪与全自动生化分析仪检测血糖结果的对比分析[J].医学理论与实践,2011,24(7):820-821.

[10] 刘建华,张艳丽.浅谈 POCT(快速)血糖仪的质量控制[J].国际检验医学杂志,2010,31(9):1024-1025.

(收稿日期:2011-05-20)

human herpesviruses in cerebrospinal fluid and blood specimens of children [J]. Acta Paediatr, 2005, 94(1): 38-43.

[5] Goegebuuer T, Van Meensel B, Beuselinc K, et al. Clinical predictive value of real-time PCR quantification of human cytomegalovirus DNA in amniotic fluid samples [J]. Clin Microbiol, 2009, 47(3): 660-665.

[6] Shan R, Wang X, Fu P. Growth and development of infants with asymptomatic congenital cytomegalovirus infection [J]. Yonsei Med, 2009, 50(5): 667-671.

[7] 王崇伟,许植之,周晓玉,等.更昔洛韦联合丙种球蛋白加早期干预对新生儿巨细胞病毒感染脑损伤的影响[J].南京医科大学学报:自然科学版,2007,27(4):326-328.

[8] ellomo-Brandao MA, Andrade PD, Costa SC, et al. Cytomegalovirus frequency in neonatal intrahepatic cholestasis determined by serology, histology, immunohistochemistry and PCR [J]. Gastroenterol, 2009, 15(27): 3411-3416.

[9] Bendiksen S, van Ghelue M, Rekvig OP, et al. A longitudinal study of human cytomegalovirus serology and viruria fails to detect active viral infection in 20 systemic lupus erythematosus patients [J]. Lupus, 2000, 9(2): 120.

[10] Göhring K, Dietz K, Hartleif S, et al. Influence of different extraction methods and PCR techniques on the sensitivity of HCMV-DNA detection in dried blood [J]. Clin Virol, 2010, 48(4): 278-281.

(收稿日期:2011-05-25)