

血液和尿液中巨细胞病毒 DNA 的检测研究

张丽科¹, 陈倩倩², 余学高², 黄彬², 刘集鸿¹, 陈培松^{2△}

(1. 惠州市第一人民医院检验科, 广东惠州 516000; 2. 中山大学附属第一医院检验医学部, 广州 510080)

摘要:目的 探讨血液和尿液不同类型标本中巨细胞病毒(CMV)-DNA 的检测研究。方法 采用实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)对 52 例患者 4 种不同类型的血液标本和 85 例患者 3 种不同类型的尿液标本的 CMV-DNA 载量进行检测, 比较血液和尿液不同类型标本的 CMV-DNA 检出率和病毒载量的差异。结果 52 例患者血清、全血、血浆和外周血单个核细胞(PBMC)的 CMV-DNA 检出率分别为 48.08%、71.15%、57.69% 和 69.23%; 全血和 PBMC 的 CMV-DNA 检出率较高, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。PBMC 的定量结果较高。85 例患者混合尿、尿上清和尿沉渣的 CMV-DNA 检出率分别为 72.94%、62.35% 和 84.71%, 尿沉渣的 CMV-DNA 检出率较高, 混合尿的定量结果较高。结论 血液和尿液标本 CMV-DNA 的检测结果差异较大, 在 CMV 感染的临床诊疗和监测中使用同一标本类型检测具有重要的临床意义。

关键词: 巨细胞病毒; 实时荧光定量聚合酶链反应; 核酸提取; 离心柱法

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.016

中图分类号: R446.6

文章编号: 1673-4130(2018)02-0179-03

文献标识码: A

Study on CMV-DNA detection in blood and urine

ZHANG Like¹, CHEN Qianqian², YU Xuegao², HUANG Bin², LIU Jihong¹, CHEN Peisong^{2△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Huizhou Municipal First People's Hospital, Huizhou, Guangdong 516000, China; 2. Department of Laboratory Medicine, First Affiliated Hospital of Sun Yat-sen University, Guangzhou, Guangdong 510080, China)

Abstract: Objective To study the detection of cytomegalovirus(CMV)-DNA in different kinds of blood and urine sample. **Methods** The CMV-DNA loads in 3 different kinds of blood sample from 52 patients and 3 different kinds of urine sample from 85 patients were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction(FQ-PCR). The differences in CMV-DNA detection rate and virus loads were compared among different kinds of blood and urine samples. **Results** The CMV-DNA detection rates in serum, whole blood, plasma and peripheral blood mononuclear cell(PBMC) from 52 patients were 48.08%, 71.15%, 57.69% and 69.23% respectively. The CMV-DNA detection rates of whole blood and PBMC were higher, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The quantitative results of PBMC was higher. The CMV-DNA detection rates of mixed urine, urine supernatant and urine sediment from 85 patients were 72.94%, 62.35% and 84.71% respectively, the CMV-DNA detection rate of urine sediment was higher, while the quantitative results of mixed urine was higher. **Conclusion** The CMV-DNA detection results of blood and urine have large difference, therefore using the same kind of sample for conducting detection has an important clinical significance in the clinical diagnosis, treatment and monitoring of CMV infection.

Key words: cytomegalovirus; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; nucleic acid extraction; spin column

我国成人巨细胞病毒(CMV)自然感染率很高, CMV 具有潜伏活动的生物学特征, CMV 一旦侵入机体, 由于机体有一个强大的免疫系统, CMV 会在宿主体内呈现持续潜伏状态, 当宿主罹患免疫缺陷性疾病和服用某些免疫抑制剂时, 机体出现免疫失调激活 CMV^[1-2]。因此, 当胎儿、婴幼儿、器官移植、肿瘤放疗、艾滋病、自身免疫性疾病等免疫功能不成熟和免

疫功能低下个体缺乏有效的免疫反应能力时, CMV 感染就会导致严重的发病率和病死率, 所以早期准确诊断 CMV 感染显得尤为重要^[3-5]。

近年来研究人员发现实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)具有较高灵敏度和特异度, 且有早期和动态监控 CMV 感染的优点, 成为 CMV 感染诊断的主要方法^[6], 但 FQ-PCR 对于样品前处理和提取过程

作者简介: 张丽科, 女, 主管技师, 主要从事分子生物学研究。△ 通信作者, E-mail: chps@mail3.sysu.edu.cn.

本文引用格式: 张丽科, 陈倩倩, 余学高, 等. 血液和尿液中巨细胞病毒 DNA 的检测研究[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2): 179-181.

没有统一的标准,不同类型的标本 CMV 检出率和 CMV-DNA 病毒载量水平可能存在差异,以致影响 CMV 感染的诊断。本研究采用 FQ-PCR 检测不同类型的血液和尿液标本的检出率和 CMV-DNA 载量水平,以评价不同类型标本对 CMV-DNA 检测的影响,对于临床日常的操作有指导和参考价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取中山大学附属第一医院 2016 年 1—8 月高度怀疑为活动性 CMV 感染的患者标本 52 例,其中 0~<6 岁 22 例、6~<25 岁 5 例、25~<80 岁 25 例,其中男性标本占 65%,女性标本占 35%。尿标本共 85 例,其中 0~<6 岁 64 例、6~<25 岁 3 例、25~<80 岁 18 例,其中男性标本占 66%,女性标本占 34%。疑似病例为排除其他病原体感染,单独或同时出现非特异性症状和体征、发热、外周血异常淋巴细胞、血小板计数减少、白细胞减少症和丙氨酸氨基转移酶升高等。

1.2 方法

1.2.1 血液标本 (1)收集分离胶静脉血标本 2 mL,3 500 r/min 离心 5 min 分离血清,取 200 μL 血清备用;(2)收集乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝静脉血标本 2 mL,取全血 200 μL 备用;(3)3 500 r/min 离心被检者 EDTA 抗凝静脉血 5 min 分离血浆,取 200 μL 血浆备用;(4)从 EDTA 抗凝管取静脉血 1 mL,使用上海华精生物公司的 Ficoll 分离液,严格按照说明书要求操作,分离提取外周血单个核细胞(PBMC),加入 200 μL 的生理盐水备用。

1.2.2 尿液标本 (1)收集被检者尿标本,密封送检,混匀取全尿标本 200 μL;(2)12 000 r/min 离心被检者尿标本 10 min,分离尿液上清 200 μL;(3)取 1 mL 被检者尿标本 12 000 r/min 离心 10 min,弃掉上清后,沉淀加入 200 μL 的生理盐水,混匀备用。

1.3 CMV-DNA 的提取和 FQ-PCR 扩增 运用离心柱法核酸提取试剂盒(DAANCorp)对各血、尿标本 CMV-DNA 进行提取和纯化,采用 ABI 7500 基因扩增仪(Applied Biosystems)对 CMV 目的基因进行 FQ-PCR 扩增,扩增条件为 93 °C,2 min 预变性;93 °C 45 s 至 55 °C 60 s,10 个循环;最后 93 °C 30 s 至 55 °C 45 s,30 个循环。根据人巨细胞病毒(HCMV)阳性定量参考品(中山大学达安基因有限公司)标准曲线计算定量结果。当拷贝数小于 10² copies/mL 为阴性,拷贝数大于或等于 10² copies/mL 为阳性。

1.4 统计学处理 统计学处理采用 SPSS22.0 和 Medcalc11.4.2.0 软件进行统计分析。DNA 拷贝数以对数 Log₁₀X 表示,不同类型标本 CMV-DNA 检出率的比较采用 χ² 检验,CMV-DNA 载量的比较采用配对 t 检验,不同标本类型结果一致性分析采用 Bland-Altman 分析,P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 52 例患者不同类型血液标本 CMV-DNA 检出率比较 52 例高度怀疑 CMV 感染的患者血清、全血、血浆和 PBMC 的 CMV-DNA 检出率分别为 48.08%、71.15%、57.69%和 69.23%,全血和 PBMC 的 CMV-DNA 检出率较高,差异有统计学意义(P<0.05),见表 1。

表 1 52 例患者不同类型血液标本 CMV-DNA 检出率比较

标本类型	阳性例数(n)	阴性例数(n)	检出率(%)
血清	25	27	48.08
血浆	30	22	57.69
全血	37	15	71.15*
PBMC	36	16	69.23*

注:与血清比较,*P<0.05

2.2 24 例不同类型血液标本同时阳性患者 CMV-DNA 载量比较 PBMC CMV-DNA 载量(3.89±0.99)、全血 CMV-DNA 载量(3.62±0.79)与血清 CMV-DNA 载量(3.10±0.89)、血浆 CMV-DNA 载量(3.31±0.93)比较,差异有统计学意义(P<0.05)。采用 Bland-Altman 图进行一致性评价,结果显示,在 95%一致限可信区间内 PBMC 分别与血清、血浆和全血进行比较,CMV-DNA 载量平均增高 0.80、0.60 和 0.28,较高的 CMV-DNA 载量为 2.34、2.18 和 1.74。

2.3 85 例患者不同类型尿液标本 CMV-DNA 检出率比较 85 例高度怀疑 CMV 感染的患者混合尿、尿上清和尿沉渣 CMV-DNA 检出率分别为 72.94%、62.35%和 84.71%,尿沉渣的 CMV-DNA 检出率最高,见表 2。

表 2 85 例不同类型尿标本 CMV-DNA 检出率比较

标本类型	阳性例数(n)	阴性例数(n)	检出率(%)
尿上清	53	32	62.35
混合尿	62	23	72.94
尿沉渣	72	13	84.71*

注:与尿上清比较,*P<0.05

2.4 53 例不同类型尿液标本同时阳性患者 CMV-DNA 载量比较 尿上清 CMV-DNA 载量为(3.99±1.43),尿沉渣 CMV-DNA 载量为(4.17±1.34),混合尿 CMV-DNA 载量为(4.53±1.49),混合尿的定量结果较高,混合尿的 CMV-DNA 载量与尿上清和尿沉渣比较,差异有统计学意义(P<0.05)。Bland-Altman 图一致性分析显示,在 95%一致限可信区间内,CMV-DNA 载量平均增高 0.52 和 0.35,较高的 CMV-DNA 载量为 1.66 和 1.58。

3 讨论

CMV 产毒性感染的检测方法有低基质磷酸化蛋白(pp65)抗原血症检测和 FQ-PCR CMV-DNA 检测,因 FQ-PCR 检测方法具有更高的灵敏度^[7],目前

已成为临床检测 CMV 感染的一线检测方法。

由于 FQ-PCR 对于标本类型、提取方法等没有统一的标准,以致有可能出现患者在同一时期不同实验室的结果,不具可比性或者同一实验室由于标本类型不同导致结果存在明显差异的现象。因此,为保证结果的一致性和可比性,研究者做了这方面的分析。

本研究选择了 52 例高度怀疑 CMV 感染的患者,同时收集其血清、血浆、全血和 PBMC 类型的标本,平行检测。为了保证结果的可比性,统一使用了离心柱提取的做法。本研究结果提示, PBMC 的 CMV-DNA 检出率与病毒载量水平均较其他标本类型高,这与沈丹等^[8]在国内的报道一致。Bland-Altman 分析提示在 95% 一致限可信区间内 PBMC 与血清、全血和血浆间病毒载量差值的绝对值最大为 2.34。这种差异会对 CMV 感染的临床诊疗与监测带来明显影响。所以在临床 CMV-DNA 血液学感染诊断中,研究者认为分离 PBMC 能有效提高病毒浓度,可以较好地发现早期 CMV 感染,能预防性地对 CMV 感染危险因素的患者进行治疗,达到早期治疗潜伏性 CMV 感染的目的。

对于尿液标本,本研究选择了 85 例高度怀疑 CMV 感染患者的标本,按照临床上常用的类型,分为混合尿、尿沉渣和尿上清,同样采用离心柱的方法提取 DNA。结果显示,混合尿和尿沉渣具有较高的检出率,混合尿的 CMV-DNA 载量最高;Bland-Altman 分析提示不同类型尿液标本间病毒载量差值最大绝对值为 1.66。故在 CMV-DNA 载量水平动态监测方面考虑选择混合尿有更好的优越性,也提示尿上清中有一定的 CMV-DNA 拷贝数,采用尿沉渣作为临床 CMV 检测标本,可能会存在一定的漏诊率。另外有研究者发现肾脏有间歇性排巨细胞病毒颗粒的特性,所以在用尿液作为 CMV 临床检测标本,应多次采集混合尿检测,以减少漏诊率^[9]。

CMV-DNA 的检测具有重要临床价值,然而由于目前血液或尿液标本 CMV-DNA 的检测没有统一的

前处理规范,标本类型的差异会影响病毒的检出率,同一患者不同类型标本的病毒载量水平也存在差异。因此需要对前处理的过程进行统一和规范,例如在结果报告中注明使用的试剂、提取方法和标本类型等,以保证可比性。

参考文献

- [1] 俞苏蒙,叶晓波,邢云卿,等. 新兵人群人巨细胞病毒感染的血清流行病学调查[J]. 现代预防医学,2010,37(20):3927-3928.
- [2] 吕静娟,胡文胜,余坚,等. 温州市区育龄妇女孕前巨细胞病毒感染现状调查[J]. 中国优生与遗传杂志,2011,32(2):100-101.
- [3] 叶贝. 儿童巨细胞病毒感染的研究进展[J]. 中国保健营养,2016,26(3):119-120.
- [4] 陈兰兰,倪安平. 免疫抑制患者巨细胞病毒感染的实验室检测及临床意义[J]. 中华检验医学杂志,2014,37(2):155-158.
- [5] ZHAO P, MA D, XUE F, et al. Seroprevalence and risk factors of human cytomegalovirus infection in the eastern Chinese population[J]. Arch Virol, 2009, 154(4):561-564.
- [6] SOLANA R, TARAZONA R, AIELLO A E, et al. CMV and Immunosenescence: from basics to clinics[J]. Immun Age, 2012, 9(1):1-9.
- [7] 张莉,周健,魏旭东,等. 不同方法检测同种异基因造血干细胞移植受者巨细胞病毒感染的探讨[J]. 中国实验血液学杂志,2007,15(3):558-562.
- [8] 沈丹,黄少军,汪晶晶. 三种标本 CMV-DNA 含量检测在儿童巨细胞病毒性肝炎诊断和治疗监测中的应用[J]. 肝脏,2015,20(1):35-37.
- [9] AWADHI R, AIHARMI J, ALFADHLI S. Prevalence of cytomegalovirus DNA in cord blood and voided urine obtained from pregnant women at the end of pregnancy[J]. Med Princ Pract, 2012, 22(2):194-199.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)

(上接第 178 页)

- Bio Med, 2014, 20(1):116-125.
- [7] 陈晓宇,陈越,邓蕾. 咽拭子和外周血 EB 病毒核酸检测结果分析[J]. 实验与检验医学,2015,20(1):70-72.
 - [8] 杨柳,孙颖,陈丹,等. 外周血单个核细胞和血浆标本 EB 病毒 DNA 检测结果的比较[J]. 江苏医药,2015,6(3):693-694.
 - [9] 郭建巍. EB 病毒感染的核酸检测:标本类型的选择[J]. 分子诊断与治疗杂志,2016,8(3):145-149.
 - [10] 康喜讯,万世恒. 鼻咽组织和外周血 EB 病毒 DNA 检测

用于早期诊断鼻咽癌[J]. 临床医学工程,2012,19(10):1697-1698.

- [11] 于谨铭,罗兵. EBV-DNA 检测在儿童 EB 病毒感染中的临床意义[J]. 医学检验与临床,2012,23(5):1673-1675.
- [12] 严海燕,罗晓红,陈娟,等. EB 病毒抗体和 DNA 联合检测可提高儿童传染性单核细胞增多症的诊断灵敏度[J]. 中国微生态学杂志,2011,23(6):540-542.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)