

- [10] TAJBAKHSR R, QORBANI M, MEHRPOUR G, et al. Effect of hemodialysis on oxidants and antioxidant factors in chronic renal failure [J]. Saudi J Kidney Dis Transpl, 2017, 28(3):507-516.
- [11] PIRET SE, OLINGER E, REED A C, et al. A mouse model for inherited renal fibrosis associated with endoplasmic reticulum stress [J]. Dis Model Mech, 2017, 10(6):773-786.
- [12] DELGADO J, MASOLI J A H, BOWMAN K, et al. Out-
• 短篇论著 •

comes of treated hypertension at age 80 and older: cohort analysis of 79,376 individuals [J]. J Am Geriatr Soc, 2017, 65(5):995-1003.

- [13] 张平侠, 孙燕. 综合护理干预对慢性肾衰竭患者负面情绪、治疗依从性及生存质量的影响 [J]. 检验医学与临床, 2016, 13(21):3075-3077.

(收稿日期:2018-03-18 修回日期:2018-06-08)

血清与尿液标本巨细胞病毒 DNA 联合检测在肾移植受者中的应用价值*

陈洁晶, 陈怀周, 欧明林, 莫秋菊, 杨 孟, 眭维国, 赖柳生, 林 华[△]
(中国人民解放军第一八一医院中心实验室/广西代谢性疾病研究重点实验室/
桂林市肾脏病研究重点实验室, 广西桂林 541002)

摘 要:目的 探讨血清和尿液标本中巨细胞病毒(CMV)DNA 的检测对肾移植受者的临床意义。方法 采用实时荧光定量 PCR 检测 174 例临床肾移植受者血清与尿液中巨细胞病毒 DNA 载量并对其进行统计分析。结果 174 例受者中尿液标本 CMV-DNA 阳性率(16.1%)明显高于血清(5.2%), 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。通过对实验结果进行比较分析发现, 尿液标本灵敏度明显高于血清标本。结论 临床选择 CMV 的送检样本类型对提高其检出率具有重要意义, 同时检测能较大地提高肾移植受者 CMV 的检出率。

关键词:肾移植; 巨细胞病毒; 实时荧光定量 PCR; 血清; 尿液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.20.029

中图法分类号:R446.5;R617

文章编号:1673-4130(2018)20-2569-03

文献标识码:B

巨细胞病毒(CMV)是人类一种双链 DNA 的疱疹类病毒, 具有高度的种属特异性与潜伏-活化的生物学特性^[1]。这种病毒在全世界广泛流行, 其中在发达国家的感染率达 30%~70%, 而我国人群的感染率在 90%以上, 其中在各种免疫功能低下的人群中更为常见^[2]。CMV 感染为肾移植术后受者死亡的重要原因之一。肾移植异体移植术后, 受者需要用大剂量的免疫抑制剂进行治疗, 引起机体免疫力下降, 从而激活病毒, CMV 的感染率能增加 1 倍, 其导致靶器官损害, 严重者可致死亡, 其病死率可达 25%。CMV 感染一般多发生在移植术后 2~6 个月, 其感染率可高达 60%~80%, 其中 CMV 肺炎最严重, 其起病快、病情凶险, 易合并真菌、细菌、原虫等混合感染^[3]。CMV 感染还显著影响肾移植受者外周 T 细胞的数量与表型, 如可增加 CD56⁺ T 细胞数量, 从而会影响其肾功能状态, 并可下调自然杀伤细胞(NK 细胞)中 CD226 与 CD16 分子的表达^[4-6]。因此, CMV 感染的早期诊断与预防显得十分重要。本研究运用实时荧光定量聚合酶链反应法(FQ-PCR)检测 CMV 感染肾移植受者

血清和尿液标本中 CMV-DNA 水平, 以探讨不同类型标本在肾移植受者 CMV 感染疾病检测中的诊断价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2015 年 1 月至 2017 年 8 月在中国人民解放军第一八一医院肾脏科肾移植相关受者 174 例, 其中男 124 例, 女 50 例; 年龄 15~64 岁, 平均 43.6 岁。

1.2 仪器与试剂 实时荧光定量 PCR 扩增仪为美国 ABI7500; FQ-PCR 检测采用人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒(PCR-荧光法), 购自中山大学达安基因股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本收集 留取新鲜晨尿 2 mL 于干净无菌试管中, 留取的标本应立即送往实验室, 如不能立即检测, 标本置于冰箱中保存。同时抽取受者静脉血 2 mL 于普通管用于 CMV-DNA 检测。

1.3.2 标本处理 尿液标本充分混匀后吸取 1 mL 于无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清取

* 基金项目: 广西自然科学基金资助项目(2017GXNSFAA198185); 桂林市研究与技术开发计划项目(20170117-1)。

[△] 通信作者, E-mail: linhuayanbama@126.com。

本文引用格式: 陈洁晶, 陈怀周, 欧明林, 等. 血清与尿液标本巨细胞病毒 DNA 联合检测在肾移植受者中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(20):2569-2571.

沉淀,加入 50 μ L DNA 提取液混匀。100 $^{\circ}$ C 金属浴孵育 10 min(误差不超过 1 min),12 000 r/min 离心 5 min,取含病毒 DNA 的上清液 2 μ L 做 PCR 扩增。血清标本抽取受检者静脉血 2 mL,3 500 r/min 离心 5 min,吸取上清至一无菌 1.5 mL EP 管,即为血清标本。取 50 μ L 血清加入 50 μ L DNA 提取液打匀,100 $^{\circ}$ C 保温 10 min,12 000 r/min 离心 5 min,取含病毒 DNA 的上清液 2 μ L 做 PCR 扩增。

1.3.3 样本检测 取 CMV PCR 反应管,分别加入处理后上清液含病毒 DNA 2 μ L,6 000 r/min 离心 1 min。将各反应管放入定量 PCR 仪器的样品槽内设置样品名称、标记荧光基团种类,循环条件为 93 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,然后按 93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,共 10 个循环,最后按 93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,共 30 个循环,于 55 $^{\circ}$ C 45 s 末收集定量荧光信号。根据阳性定量参考品的 CT 值作标准曲线,通过样品的 CT 值计算 DNA 病毒载量,DNA 拷贝数 \geq 500 copies/mL 为阳性,DNA 拷贝数<500 copies/mL 为阴性。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件处理数据,阳性率的比较采用 χ^2 检验,定量结果的比较采用 t 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血清和尿液标本 CMV-DNA 阳性率比较 174 例肾移植受者中血清标本 CMV-DNA 阳性率为 5.2%,显著低于尿液 CMV-DNA 的 16.1%,差异有统计学意义($P<0.05$)。血清和尿液中男、女阳性率比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 血清和尿液标本 CMV-DNA 阳性率比较[n(%)]			
分组	<i>n</i>	血清	尿液
男	124	7(5.6)	19(15.3)
女	50	2(4.0)	9(18.0)
合计	174	9(5.2)	28(16.1) ^a

注:与血清 CMV-DNA 阳性率比较,^a $P<0.05$

2.2 血清和尿液标本检测符合率 在 174 份样本中,两类标本的符合率为 86.8%(151/174),阳性符合率为 77.8%(7/9),阴性符合率为 87.3%(144/165),见表 2。

表 2 血清和尿液标本中 CMV-DNA 检测的符合率[n(%)]			
组别	尿液 CMV-DNA	血清 CMV-DNA	
		阳性	阴性
阳性	28(16.1)	7(4.0)	21(12.1)
阴性	146(83.9)	2(1.1)	144(82.8)
合计	174(100.0)	9(5.1)	165(94.9)

2.3 血清和尿液标本中 CMV-DNA 定量结果比较 在实验阳性的标本中比较两种标本的阳性率发现,血清标本在 $10^4\sim10^5$ copies/mL 区间的阳性率为 [55.6%(5/9)] 高于尿液标本 [14.3%(4/28)],但在其他区间尿液标本阳性率均高于血清标本,而从两组全部区间的定量结果比较分析,两组标本的差异无统计学意义($P>0.05$)。见表 3。

表 3 尿液与血清标本中 CMV-DNA 定量结果比较								
标本类型	500~<10 ³		10 ³ ~<10 ⁴		10 ⁴ ~<10 ⁵		10 ⁵ ~10 ⁶	
	阳性	拷贝数	阳性	拷贝数	阳性	拷贝数	阳性	拷贝数
	[<i>n</i> (%)]	($\bar{x}\pm s$,copies/mL)	[<i>n</i> (%)]	($\bar{x}\pm s$,copies/mL)	[<i>n</i> (%)]	($\bar{x}\pm s$,copies/mL)	[<i>n</i> (%)]	($\bar{x}\pm s$,copies/mL)
尿液	10(35.7)	(1.52±0.35)×10 ³	11(39.3)	(8.20±4.61)×10 ³	4(14.3)	(1.05±0.46)×10 ⁵	3(10.7)	(2.97±2.42)×10 ⁶
血清	1(11.1)	1.35×10 ³	3(33.3)	(3.06±1.43)×10 ³	5(55.6)	(5.48±4.29)×10 ⁴	0(0.0)	0.00

3 讨 论

CMV 首次感染后一般呈现潜伏感染状态,可在人体免疫低下如器官移植后再活化进而引起严重的感染,而老年受者感染风险更高^[7]。一般人 CMV 感染多是隐性感染或者有轻微症状,但在新生儿、器官移植受者和免疫功能低下人群中,CMV 感染具有严重的临床表现,如非特异性发热反应,组织感染如间质性肺炎、致盲性 CMV 视网膜炎,器官移植术后发生排斥反应等^[8]。

本研究对象为肾移植受者,该类患者免疫系统功能显著低于健康人,其 CMV 感染为导致肾移植失败的重要原因之一,因而移植术后预防 CMV 感染十分重要。CMV 一般与宿主细胞结合,主要是激活补体与抗体依赖的细胞毒杀伤作用。CMV 感染的早期临

床症状不明显,其诊断一般依赖于各种实验技术手段^[9]。目前,检测 CMV 的方法有直接检测、血清中抗体的检测、病毒分离培养、病毒抗原检测、荧光定量 PCR 技术检测血和尿中 DNA 水平等^[10-12]。准确而高效地检出 CMV,对于有效控制肾移植术后出现并发症有着重要的临床意义,可进一步提高受者术后的生存率。目前传统方法 pp65 抗原检测容易出现假阴性,而定量 PCR 技术可以在临床出现 CMV 感染症状之前检出 CMV-DNA,可为早期诊断、早期治疗提供实验室依据。PCR 技术可用于检测临床多种类型标本中的 CMV-DNA,其所需的标本量很小,灵敏度高,具有简便快速的特点^[13]。CMV 定量 PCR 实验中,中等到高拷贝数出现 CMV 病的比例远远高于低拷贝数,这也较好地反映了 CMV 感染的严重程度。本研

究结果显示,174 例肾移植受者血清与尿液标本 CMV-DNA 的总阳性率分别为 5.2% 与 16.1%。尿液 CMV-DNA 阳性率明显高于血清 CMV-DNA 的阳性率,差异有统计学意义($P<0.05$),提示送检不同类型的标本会对 CMV 的阳性率产生影响,在肾移植受者中同时检测其血清和尿液标本中 CMV-DNA 水平可以提高其阳性率,以帮助临床早期诊断。尿液 CMV-DNA 阳性率高的原因主要是因为 CMV 易侵犯肾管道上皮细胞,并在肾小球与肾小管上皮细胞内复制,随后从尿液中排出,因此阳性率较高^[14]。尿液标本中 CMV 水平能较好地反映机体内 CMV 载量,且取样方便、无创、易被受者接受,对于需要长期监测 CMV 载量的移植受者,尿液标本为最合适的检测标本,也是理想的临床检测标本。但尿液取材易污染且 CMV 感染治愈后仍有排毒现象,易引起实验假阳性,需要注意。另一方面,CMV 感染机体后侵入细胞并开始增殖,增殖到一定程度后可诱发宿主细胞凋亡,同时释放出宿主细胞里的病毒,当血清里的病毒到达一定量后,才能检测到 CMV,因而血清的阳性率较低。但血清标本阳性率可较好地反映 CMV 感染的活动性,对疾病有着较好的评估作用。

通过本实验定性结果分析,可看到血清和尿液标本对 CMV-DNA 均有较好的特异度及灵敏度,二者差异均有统计学意义($P<0.05$),二者又有较好的定性符合率(86.8%),阳性符合率为 77.8%,阴性符合率为 87.3%。本研究结果显示,当尿液 CMV-DNA 阳性的情况下,受者血清 CMV-DNA 存在较大的阴性比例 75.0%(21/28)。这提示尿液 CMV-DNA 的检测是对常规血清检测的一种有效补充,可降低漏检率,而这对肾移植免疫功能低下的受者具有十分重要的临床意义。此外,本实验还发现了 2 例尿液 CMV-DNA 阴性而血清阳性的标本,其可能与 CMV 尿液间歇性排毒相关,处于不排毒状态时,检测的标本类型可出现与临床诊断不符的现象,因此需要反复、连续多次检测尿液中的 CMV-DNA,以提高检出率^[15]。本研究中定量结果显示,尿液 CMV-DNA 定量结果值普遍高于血清,表明其检测灵敏度更好。这也证实了尿液为病毒的重要载体,其内部的病毒核酸载量要比释放到血清中的更高。如果肾移植受者条件不允许,临床应该优先选择尿液标本,反之,最好同时留取血清和尿液标本以提高 CMV 检出率,防止漏检,以便及时给予受者进行抗病毒治疗,这对于降低疾病的严重程度与病死率至关重要。因此,尿液与血清 CMV-DNA 联合检测将有助于受者 CMV 感染的辅助诊断。

4 结 论

此项研究可以为临床提供实验室参考依据,根据受者的具体情况选择送检标本类型,以提高病毒检出率,达到早期诊断、早期治疗的目的。

参考文献

- [1] LI G, KAMIL J P. Viral regulation of cell tropism in human cytomegalovirus[J]. J Virol, 2016, 90(2): 626-629.
- [2] TANG N, LI J W, LIU Y M, et al. Human cytomegalovirus infection is associated with essential hypertension in Kazakh and Han Chinese populations[J]. Med Sci Monit, 2014, 20: 2508-2519.
- [3] JIRASIRITHAM S, KHUNPRAKANT R, TECHAWATHANAWANNA N, et al. Treatment of simultaneous acute antibody-mediated rejection and acute cellular rejection with alemtuzumab in kidney transplantation: a case report[J]. Transplant Proc, 2010, 42(3): 987-989.
- [4] MEIJERS R W, LITJENS N H, HESSELINK D A, et al. Primary cytomegalovirus infection significantly impacts circulating T cells in kidney transplant recipients[J]. Am J Transplant, 2015, 15(12): 3143-3156.
- [5] ALMEHMADI M, HAMMAD A, HEYWORTH S, et al. CD56+ T cells are increased in kidney transplant patients following cytomegalovirus infection[J]. Transpl Infect Dis, 2015, 17(4): 518-526.
- [6] LIU Z, YU T, SUN S, et al. Cytomegalovirus infection down-regulates the expressions of CD226 and CD16 in blood NK cells of the renal transplant recipient[J]. Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi, 2015, 31(10): 1391-1395.
- [7] CHIASAKUL T, TOWNAMCHAI N, JUTIVORAKOOL K, et al. Risk factors of cytomegalovirus disease in kidney transplant recipients: a single-center study in Thailand[J]. Transplant Proc, 2015, 47(8): 2460-2464.
- [8] NANDWANI A, JHA PK, DUGGAL R, et al. Invasive gastric mucormycosis and cytomegalovirus infection in an ABO incompatible renal transplant recipient[J]. Indian J Nephrol, 2015, 25(6): 373-376.
- [9] 董姐姐, 苏犁云, 叶丽静, 等. 荧光定量 PCR 检测新生儿干血斑中巨细胞病毒 DNA 方法的建立及评价[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(4): 261-265.
- [10] 刘聪, 戴薇, 肖德俊, 等. 巨细胞病毒感染诊断方法的研究进展[J]. 实验与检验医学, 2014, 32(6): 703-704.
- [11] 姚晔, 万琼, 王卫国, 等. 应用 FQ-PCR 和 ELISA 方法检测人巨细胞病毒感染的临床价值[J]. 实验与检验医学, 2012, 30(2): 172-173.
- [12] 王垒, 彭贵主. 肾移植术后巨细胞病毒感染的早期诊断[J]. 肾脏病与透析肾移植杂志, 2016, 25(3): 286-290.
- [13] 潘晓东, 白永恒, 张岩, 等. 肾移植受者巨细胞病毒隐性感染的筛查方法及应用[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(9): 55-57.
- [14] 张丽娜. 巨细胞病毒感染与儿童特发性血小板减少性紫癜的关系[J]. 江苏医药, 2005, 31(2): 140.
- [15] 谢康, 刘艳秋, 阳彦, 等. 母乳、小儿血液及尿液标本中检测巨细胞病毒对诊断小儿 HCMV 感染的临床应用[J]. 实验与检验医学, 2017, 35(3): 340-343.