

徐州地区 0~8 岁儿童尿液 HCMV-DNA 结果分析*

宋子威¹, 张 微², 刘志坚¹, 李 颖¹, 李世宝^{1,3△}(1. 徐州医科大学附属医院检验科, 江苏徐州 221002; 2. 徐州市泉山社区卫生服务中心
检验科, 江苏徐州 221002; 3. 徐州医科大学医学技术学院, 江苏徐州 221002)

摘要:目的 分析徐州地区儿童人巨细胞病毒(HCMV)感染情况及临床特点。方法 以 2017 年 1 月至 2018 年 12 月徐州医科大学附属医院就诊的 1 095 例疑似 HCMV 感染患儿为研究对象, 采用实时荧光定量 PCR(qPCR)技术检测患儿尿液及其母乳的 HCMV-DNA 载量。结果 1 095 例患儿尿液 HCMV-DNA 阳性 348 例, 阳性率为 31.78%, 不同性别阳性率比较差异无统计学意义($P=0.5784$)。随着年龄增长阳性率先升高后降低, 高峰集中在 5~12 月龄。进一步分析发现不同季节阳性率差异无统计学意义($P>0.05$), 农村患儿阳性率明显高于城镇患儿($P<0.001$)。结论 徐州地区儿童 HCMV 感染率较高, 且以婴幼儿期感染为主。母乳期的 HCMV 再激活具有很高的发生率, 并与婴幼儿感染密切相关。HCMV 感染可累及多个脏器, 患儿易出现呼吸道感染、肝炎综合征、造血系统受损等临床表现。

关键词: 人巨细胞病毒; 实时荧光定量聚合酶链反应; 儿童; 尿液

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2019.22.016 中图分类号:R446.1

文章编号:1673-4130(2019)22-2752-04 文献标识码:A

Analysis of HCMV-DNA in urine of children aged 0—8 years in Xuzhou area*

SONG Ziwei¹, ZHANG Wei², LIU Zhijian¹, LI Ying¹, LI Shibao^{1,3△}

(1. Department of Clinical Laboratory, Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Community Health Service Center in Quanshan District, Xuzhou, Jiangsu 221002, China; 3. School of Medical Technology, Xuzhou Medical University, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: **Objective** To analyze the clinical characteristics of human cytomegalovirus (HCMV) infection in children in Xuzhou area. **Methods** A total of 1 095 children with suspected HCMV infection in the Affiliated Hospital of Xuzhou Medical University from January 2017 to December 2018 were studied. The HCMV-DNA loads in urine and breast milk were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qPCR). **Results** There were 348 cases of HCMV-DNA positive in urine of 1 095 children, the positive rate was 31.78%. There was no significant difference in the positive rate between different genders ($P=0.5784$). With the increase of age, the positive rate first increased and then decreased, and the peak was concentrated in 5—12 months. Further analysis showed that there was no significant difference in the positive rate between different seasons ($P>0.05$), and the positive rate of rural children was significantly higher than that of urban children ($P<0.001$). **Conclusion** The infection rate of HCMV in children in Xuzhou area is higher, and mainly in infants. HCMV reactivation in breast milk has a high incidence and is closely related to infant infection. HCMV infection can involve multiple organs, and children are prone to respiratory tract infection, hepatitis syndrome, hematopoietic system damage and other clinical manifestations.

Key words: human cytomegalovirus; real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction; children; urine

人巨细胞病毒(HCMV)属于 β 疱疹病毒亚科, 具有严格的种属特异性和潜伏-活化的生物学特性, 属于

人类普遍易感的常见病原体之一。原发感染以婴幼儿时期为主, 大多为无临床症状的潜伏感染^[1]。HC-

* 基金项目: 江苏省卫生与计划生育委员会青年基金项目(Q2017010)。

作者简介: 宋子威, 男, 检验技师, 主要从事临床分子诊断研究。△ 通信作者, E-mail: sdjnsblb@163.com。

本文引用格式: 宋子威, 张微, 刘志坚, 等. 徐州地区 0~8 岁儿童尿液 HCMV-DNA 结果分析[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(22): 2752-

MV 是引起先天性及围生期感染的重要病原体,可通过胎盘、产道、母乳或密切接触直接传播给婴儿,导致死胎、流产、早产、生长发育迟缓、畸形及迟发的智力低下、听力损害等不良妊娠结局^[2-3],严重影响新生儿的健康。在器官移植、恶性肿瘤、采用免疫抑制剂治疗等免疫功能低下者中,HCMV 感染甚至可以引起患者死亡^[4]。为了解徐州地区儿童 HCMV 的感染情况,现对 2017 年 1 月至 2018 年 12 月检测结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选择 2017 年 1 月至 2018 年 12 月来徐州医科大学附属医院就诊的疑似 HCMV 感染患儿 1 095 例为研究对象。其中男 676 例,女 419 例,男女比例为 1.61 : 1;年龄 0 d 至 8 岁,中位年龄 4 个月。对患儿尿液及其母乳分别进行 HCMV-DNA 检测,尿液 1 095 份,母乳 108 份,尿液和母乳配对样本 105 份。

1.2 仪器与试剂 ABI7500 实时荧光定量 PCR (qPCR) 仪、Eppendorf 高速冷冻离心机、Eppendorf 金属浴恒温器、Eppendorf 漩涡振荡仪;HCMV-DNA qPCR 试剂盒,购自上海之江生物科技股份有限公司。

1.3 方法

1.3.1 标本采集与处理 尿液样本:无菌试管留取患儿 1 d 内 3 次混合尿液 5.0 mL,充分混匀后吸取尿液 1.0 mL 于 1.5 mL 的无菌离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;沉淀加无菌生理盐水 1.0 mL 混匀,15 000 r/min 离心 5 min,弃上清;沉淀加入 50 μ L 核酸抽提液漩涡混匀,100 $^{\circ}$ C 干浴 10 min,使病毒颗粒完全裂解,然后 13 000 r/min 离心 10 min,保留上清备用。乳汁样本:清洁乳头后用自我挤压法挤出约 5 mL 乳汁入无菌试管中,3 000 r/min 离心 5 min,吸取脂质下层乳清 1.0 mL 于 1.5 mL 的无菌离心管中,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清;沉淀加入 50 μ L 核酸抽提液漩涡混匀,100 $^{\circ}$ C 干浴 10 min,使病毒颗粒完全裂解,然后 13 000 r/min 离心 10 min,保留上清备用。

1.3.2 qPCR 扩增 取 4 μ L DNA 模板加入定量 PCR 反应液中,放入 ABI 7500 qPCR 仪进行扩增。扩增条件为 37 $^{\circ}$ C 2 min,94 $^{\circ}$ C 2 min,1 个循环;93 $^{\circ}$ C 15 s $\rightarrow$ 60 $^{\circ}$ C 1 min,40 个循环;单点荧光采集在 60 $^{\circ}$ C。每次试验设置阴性、阳性对照。

1.3.3 结果判读 PCR 反应结束后,电脑根据标准曲线自动分析计算检测结果。HCMV-DNA 载量以基因拷贝/毫升表示,HCMV-DNA>500 拷贝/毫升为阳性。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS17.0 软件进行统计分析,计数资料以例数或率表示,组间比较采用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同性别患儿尿液 HCMV-DNA 检测结果

1 095 例患儿中阳性 348 例(31.78%);阴性 747 例(68.22%)。其中男童阳性 219 例,阳性率 32.40%;女童阳性 129 例,阳性率 30.79%,男女阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2=0.308\ 8,P=0.578\ 4$)。

2.2 不同年龄段患儿尿液 HCMV-DNA 检测结果 169 例不足 1 月龄患儿中仅 1 例阳性;1 月龄之后阳性率逐渐升高,在 5~6 月龄升至最高,为 55.74%,1~2 月龄、3~4 月龄、5~6 月龄 3 个年龄段阳性率两两比较差异均有统计学意义($\chi^2=15.429\ 2,59.516\ 6,14.448\ 5$,均 $P<0.001$);7~12 月龄阳性率与 5~6 月龄比较变化不大($\chi^2=0.076\ 8,P=0.781\ 7$);随着年龄增长阳性率逐渐降至 4.88%($\chi^2=19.709\ 6,P<0.001$)。见表 1。

表 1 0~8 岁患儿各年龄段尿液 HCMV-DNA 检测结果

年龄	总数(n)	阳性(n)	阳性率(%)
0~<1 月	169	1	0.59
1~2 月	225	36	16.00
3~4 月	160	53	33.13
5~6 月	122	68	55.74
7~<12 月	238	129	54.20
1~3 岁	140	59	42.14
4~8 岁	41	2	4.88
合计	1 095	348	31.78

2.3 不同季节患儿尿液 HCMV-DNA 检测结果 春季(3~5 月份)、夏季(6~8 月份)、秋季(9~11 月份)、冬季(12~次年 2 月份)阳性率分别为 31.77%、31.20%、29.34%、33.16%,差异无统计学意义($\chi^2<0.001,P>0.05$)。见表 2。

表 2 0~8 岁患儿各季节尿液 HCMV-DNA 检测结果

季节	总数(n)	阳性(n)	阳性率(%)
春季	299	95	31.77
夏季	234	73	31.20
秋季	167	49	29.34
冬季	395	131	33.16
合计	1 095	348	31.78

2.4 不同居住地患儿尿液 HCMV-DNA 检测结果 576 例来自农村的患儿阳性 216 例,阳性率为 37.50%;519 例来自城镇的患儿阳性 132 例,阳性率为 25.43%。两组阳性率差异有统计学意义($\chi^2=18.334\ 3,P<0.001$)。

2.5 108 例母乳 HCMV-DNA 检测结果 108 例母乳样本中 HCMV-DNA 阳性 45 例,阳性率为 41.67%。在 105 例母子配对样本检测中,患儿尿液 HCMV-DNA 阳性的 57 例中母乳阳性 40 例,占 70.16%;患儿尿液 HCMV-DNA 阴性的 48 例中母乳

阳性 4 例,占 8.33%,差异有统计学意义($\chi^2 = 40.9347, P < 0.001$)。见表 3。

表 3 105 例母子配对样本 HCMV-DNA 检测结果(n)			
患儿尿液 HCMV-DNA	母乳 HCMV-DNA		合计
	阳性	阴性	
阳性	40	17	57
阴性	4	44	48
合计	44	61	105

2.6 尿液 HCMV-DNA 阳性患儿疾病分布 患儿 HCMV 感染的相关疾病以呼吸道感染为主,其中支气管炎/肺炎所占比例最大(59.20%,206/348),其次为急性上呼吸道感染、肝炎综合征等。见表 4。

表 4 尿液 HCMV-DNA 阳性的相关疾病所占比例[n(%)]			
诊断	尿液 HCMV-DNA 阳性	诊断	尿液 HCMV-DNA 阳性
支气管炎/肺炎	206(59.19)	紫癜/粒细胞减少症	7(2.01)
急性上呼吸道感染	55(15.80)	神经系统损伤	4(1.15)
肝炎综合征	29(8.33)	2 种及以上疾病	23(6.61)
小儿肠炎	9(2.59)	其他	15(4.31)

3 讨 论

血清特异性抗体检测、尿液 HCMV-DNA 检测和血液 HCMV-DNA 检测是目前诊断 HCMV 感染的常用方法。临床上,IgG 阳性多提示既往感染。由于可以通过胎盘,新生儿血清 HCMV-IgG 水平常反映母体抗体情况。HCMV-IgM 抗体虽然能间接证实体内 HCMV 的存在,但是不可避免存在检测窗口期,并且患儿免疫功能低下,也会影响抗体生成的敏感性,导致假阴性的结果。在急性感染期,婴幼儿的泌尿道上皮细胞是 HCMV 最易侵袭的场所,此时病毒排量大,在尿液标本中稳定性好,而且与血清抗体相比,尿液 HCMV-DNA 检测快速、无创,易被患儿和家长接受,能作为判断药物疗效的定量指标。血液 HCMV-DNA 检测虽然和尿液 HCMV-DNA 检测一样,高浓度结果能提示患者体内 HCMV 处于活跃期并大量复制,但是灵敏度不如尿液 HCMV-DNA 检测^[5-7],而且属于有创检查,容易受到患儿和家属的抵触。由于肾小管排毒具有间歇性,大量饮水时尿液被稀释,检测结果阴性不能完全排除 HCMV 感染,临床上除了留取患儿多次混合尿液进行检测,联合血液 HCMV-DNA 检测是对患儿诊断 HCMV 感染的有效补充。

HCMV 感染呈全球性分布。因社会经济发展水平、卫生条件和生活习惯的不同,不同国家甚至同一国家不同地区之间感染率也存在差异。发达国家儿童血清抗体阳性率约为 50.41%;上海地区 1~3 岁儿童血清抗体阳性率为 60.37%;南京地区 0~8 岁儿童血清抗体阳性率为 82.40%;华中地区住院儿童血清

抗体阳性率为 88.11%^[8-11]。本次调查共统计 1 095 例患儿,尿液 HCMV-DNA 阳性率约为 32.00%,高于长沙地区健康婴幼儿 18.49%的阳性率^[12],亦高于东莞地区患儿 10.07%的阳性率^[13]。此外,核酸阳性率远低于抗体阳性率,表明 HCMV 进入人体后大多以排毒量小于检测下线、仅产生特异性免疫应答而不产生临床症状的隐性感染和潜伏感染为主。HCMV 感染与性别无关,无季节性,全年散发,冬季多密集,这与 HCMV 的感染特性一致。来自农村的患儿 HCMV-DNA 阳性率高于来自城镇的患儿,这提示 HCMV 感染与家庭条件和社会环境等密切相关;此外,生活方式的不断融合和统一使得城乡儿童的 HCMV 感染有逐渐接近的趋势。

HCMV 感染在各年龄段均可发生,随着年龄增长,阳性率先升高后降低,且与新生儿期(0~28 d)相比,婴儿期(28 d 至 1 岁)和幼儿期(1~3 岁)阳性率明显较高。原因可能如下:经胎盘和母乳从母体获得高滴度的 HCMV-IgG 抗体,使得患儿感染 HCMV 后多表现为不产生感染性病毒的潜伏感染;随着患儿与外界环境的不断接触,HCMV 在 HCMV-IgG 抗体阳性母亲的乳腺细胞中再激活及母源性抗体的消耗殆尽,导致发生活动性感染^[14];最后,随着患儿自主免疫的不断完善、垂直传播来源的不断清除及哺乳期的结束,活动性感染再次转变为潜伏感染。此外,本调查还提示该地区儿童 HCMV 感染在 5~12 月龄达到最高峰,这与吴美玲等^[10]的研究发现不一致,可能由检测方法、地域差异以及抽样误差引起。

母乳喂养因优点众多一直受到大力提倡,然而近年来研究却发现母乳喂养是婴幼儿 HCMV 感染的重要途径之一,有调查称乳汁排毒率为 13%~70%^[15-16]。本调查共统计 108 例乳汁样本,HCMV 阳性率为 41.67%,低于国内报道的结果 43.80%~81.63%,不排除与样本量少有关。尿检阳性患儿母乳的阳性率远大于尿检阴性患儿母乳的阳性率,高度提示母乳可能是患儿感染 HCMV 的重要途径之一。

HCMV 感染往往缺乏临床特异性,但仍有部分感染患儿伴有不同程度的肺炎、肝脾肿大、血小板减少性紫癜等,黄疸亦可为其唯一表现形式。本调查结果显示,HCMV 感染患儿以呼吸道感染居多,可能是因为婴幼儿呼吸系统发育不成熟,对病原体抵抗力差,不能充分咳嗽与咳痰;其次是肝炎综合征,提示肝脏是 HCMV 的重要靶器官之一。HCMV 肝炎患儿肝脏肿大程度比乙型肝炎病毒等嗜肝病毒所致的肝脏肿大明显,病情轻重不一,大多数治疗后预后良好,少数重症可发展为肝硬化、腹水。此外,HCMV 感染还伴有不同程度的肠炎、血小板减少等,更有部分患儿多个系统同时受到影响。由于胃肠道抵抗力差、喂养不当,婴幼儿容易出现小儿肠炎。最新资料表明,HCMV 感染与血小板减少、神经系统发育落后密切

相关^[17],而患儿粒细胞减少很有可能是抗 HCMV 药物所导致的骨髓抑制,但这种不良反应通常可以逆转,必要时给予升白细胞等措施能达到良好的治疗效果。上述研究结果提示儿科医生在临床诊疗中对 HCMV 感染要有足够的重视,及时进行检测,及早进行干预。

4 结 论

徐州地区儿童 HCMV 感染率较高,感染高峰集中在 5~12 月龄,需要加强母婴 HCMV 感染的防控工作。婴幼儿感染 HCMV 可引起多系统受累及一系列临床表现,当患儿出现原因尚不明确的上述症状时,及时进行尿液 HCMV-DNA 检测对早期诊断具有重要意义。

参考文献

- [1] 中华医学会儿科学分会感染学组,全国儿科临床病毒感染协作组,《中华儿科杂志》编辑委员会. 儿童巨细胞病毒性感染诊断和防治的建议[J]. 中华儿科杂志,2012,50(4):290-292.
- [2] 饶美兰,郑瑛,张畅斌,等. 孕妇巨细胞病毒感染及其母婴垂直传播[J]. 中国生育健康杂志,2008,19(2):91-94.
- [3] 章虎,陈迎迎,徐志伟. 巨细胞病毒感染患儿听力损害危险因素分析[J]. 国际流行病学传染病学杂志,2018,45(1):13-17.
- [4] 唐华. 人巨细胞病毒感染的实验室诊断技术研究进展[J]. 现代医药卫生,2015,31(3):383-386.
- [5] 翁玉英,倪琛,林秀凤,等. 不同标本巨细胞病毒检测在诊断小儿人巨细胞病毒感染中的应用[J]. 分子诊断与治疗杂志,2014,27(6):410-414.
- [6] 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.
- [7] 赵巍松,刘伶,杨飞. 母乳及婴儿血液、尿液人巨细胞病毒 DNA 检测在婴儿 HCMV 感染中的应用[J]. 中国实验诊断学,2013,17(6):1059-1061.

- [8] BATE S L, DOLLARD S C, CANNON M J. Cytomegalovirus seroprevalence in the United States; the national health and nutrition examination surveys, 1988 — 2004. [J]. Clin Infect Dis, 2010, 50(11):1439-1447.
- [9] FANG F Q, FAN Q S, YANG Z J, et al. Incidence of cytomegalovirus infection in Shanghai, China[J]. Clin Vaccine Immunol, 2009, 16(11):1700-1703.
- [10] 吴美玲,陈洁,钟天鹰,等. 南京市 0~8 岁儿童巨细胞病毒感染流行病学调查[J]. 中华实用儿科临床杂志,2013,28(4):298-300.
- [11] 王婷,段歌红,陈茂才,等. 人巨细胞病毒在华中地区孕妇和住院儿童群体中的流行病学调查[J]. 微生物与感染, 2015, 10(5):288-293.
- [12] 李春林,蒋雪纷. 伊犁地区汉哈维母婴巨细胞病毒感染的流行病学调查研究[J]. 医药前沿,2012,2(13):33-34.
- [13] 钟瑞芬,黎四平,梁丽云,等. 尿 HCMV-DNA 检测在新生儿疾病中的应用价值[J]. 国际检验医学杂志,2016,37(4):475-477.
- [14] MEIER J, LIENICKE U, TSCHIRCH E, et al. Human cytomegalovirus reactivation during lactation and mother-to-child transmission in preterm infants[J]. J Clin Microbiol, 2005, 43(3):1318-1324.
- [15] BRYANT P, MORLEY C, GARLAND S, et al. Cytomegalovirus transmission from breast milk in premature babies; does it matter[J]. Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed, 2002, 87(2):F75-F77.
- [16] YASUDA A, KIMURA H, HAYAKAWA M, et al. Evaluation of cytomegalovirus infections transmitted via breast milk in preterm infants with a real-time polymerase chain reaction assay[J]. Pediatrics, 2003, 111(6 Pt 1):1333-1336.
- [17] 姜毅,张小娇. 2017 孕妇及新生儿巨细胞病毒感染预防、诊断和治疗共识解读[J]. 中华新生儿科杂志,2018,33(3):161-164.

(收稿日期:2019-03-20 修回日期:2019-06-02)

(上接第 2751 页)

- [8] MA J C, QIAN J, LIN J, et al. Aberrant hypomethylation of SALL4 gene is associated with intermediate and poor karyotypes in acute myeloid leukemia[J]. Clin Biochem, 2013, 46(4/5):304-307.
- [9] 郭野,崔巍,崔京涛,等. 急性髓细胞白血病中婆罗双树样基因 4 的表达及其临床意义[J]. 中华检验医学杂志, 2009, 32(1):25-29.
- [10] MURPHY T, YEE K W L. Cytarabine and daunorubicin for the treatment of acute myeloid leukemia[J]. Expert Opin Pharmacother, 2017, 18(16):1765-1780.
- [11] PERL A E. The role of targeted therapy in the management of patients with AML[J]. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2017, 2017(1):54-65.
- [12] ZHANG J, GU Y, CHEN B. Mechanisms of drug resist-

ance in acute myeloid leukemia[J]. Onco Targets Ther, 2019, 12:1937-1945.

- [13] NABISSI M, MORELLI M B, AMANTINI C, et al. Canabidiol stimulates Aml-1a-dependent glial differentiation and inhibits glioma stem-like cells proliferation by inducing autophagy in a TRPV2-dependent manner[J]. Int J Cancer, 2015, 137(8):1855-1869.
- [14] CHANG X B. Molecular mechanism of ATP-dependent solute transport by multidrug resistance-associated protein 1[J]. Methods Mol Biol, 2010, 596(1):223-249.
- [15] LU J F, POKHAREL D, BEBAWY M. MRP1 and its role in anticancer drug resistance[J]. Drug Metab Rev, 2015, 47(4):406-419.

(收稿日期:2019-03-30 修回日期:2019-06-12)