

· 短篇论著 ·

造血干细胞移植术后患者血浆和外周血单个核细胞中人巨细胞病毒载量及其变化趋势分析

王克迪¹,徐东江²,苏建荣^{1△}

1. 首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心,北京 100050;

2. 首都医科大学附属北京积水潭医院检验科,北京 100035

摘要:目的 比较分析造血干细胞移植术后患者血浆和外周血单个核细胞(PBMCs)中人巨细胞病毒核酸(CMV-DNA)的载量及其变化趋势,旨在探讨CMV-DNA检测中标本的合理选择。方法 采用回顾性分析,纳入48例造血干细胞移植术后患者,采用实时荧光定量PCR法,每周检测1次CMV-DNA,连续监测9周。比较432份标本的血浆和外周血单个核细胞中CMV-DNA载量,并分析其变化趋势。结果 432份标本中,40份标本在两种标本类型中呈现出不一致的定性检测结果,其中血浆阳性而PBMCs阴性标本5份,血浆阴性而PBMCs阳性标本35份,两种标本类型中病毒检出率差异有统计学意义($\chi^2=292.376, P<0.001$)。血浆和PBMCs的CMV-DNA载量分别为[0(0,2 265)]copy/mL和[443(0,33 100)]copy/mL,PBMCs中的病毒拷贝数高于血浆中病毒拷贝数($P<0.001$)。Spearman相关性分析显示,血浆和PBMCs中CMV-DNA载量呈正相关($r=0.890, P<0.001$)。在病毒载量的上升阶段,-4和-3周时,血浆标本中分别有9份和7份标本病毒拷贝数低于检测下限,而PBMCs中,仅有1份标本病毒拷贝数低于检测下限,提示PBMCs具有更好的敏感性,可以在早期监测到CMV感染情况。在病毒载量下降阶段,+2,+3和+4周时,血浆标本中分别有2份、9份和12份标本病毒拷贝数低于检测下限,而PBMCs中,分别有1份、2份和2份标本病毒拷贝数低于检测下限,提示在疾病恢复期,血浆中病毒载量下降更明显,能更早地反映疾病的转归。结论 对于CMV感染的诊断与监测,不同标本类型中CMV-DNA载量呈现出疾病病程差异性和患者个体差异性,临幊上应根据疾病的病程和患者的具体情况合理选择标本类型。

关键词:人巨细胞病毒; 核酸; 外周血单个核细胞; 血浆; 造血干细胞移植

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.23.025

文章编号:1673-4130(2024)23-2941-04

中图法分类号:R446.1

文献标志码:A

人巨细胞病毒(CMV)属疱疹病毒科,可引起人类巨细胞病毒感染^[1]。在大多数免疫功能正常个体中呈无症状感染,而当机体免疫缺陷或免疫系统处于抑制状态时,CMV可侵入肺、肝、肾、唾液腺等腺体,以及多核白细胞和淋巴细胞,可长期或间隙地从唾液、乳汁、尿液、精液、子宫分泌物等多处排出病毒,导致严重感染和较高的病死率。此外,CMV感染还见于胎儿、婴幼儿和孕妇,孕妇感染可导致胎儿先天畸形^[2]。因此,快速准确地定量检测CMV核酸(CMV-DNA)尤为重要。荧光定量PCR法具有高灵敏度和高特异度等优点,是目前用于CMV-DNA定量检测的主要方法^[3-4]。临幊上,用于检测的标本种类较多,包含血浆、外周血单个核细胞(PBMCs)、全血和组织等。但是,哪一种标本类型更适合于CMV感染的诊断和监测,以及不同标本类型的临幊意义,都有待进一步探讨。本研究以造血干细胞移植术(HSCT)后患者为研究对象,探讨CMV-DNA检测中标本类型的合理选择。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究采用回顾性分析,收集2023年9月至2024年2月在首都医科大学附属北京友谊医院行CMV-DNA检测的HSCT术后患者,共48例,每周检测1次CMV-DNA,连续监测9周,共432

份外周血标本。患者中男26例,女22例;年龄15~54岁。

1.2 仪器与试剂 本研究采用全自动荧光定量PCR仪(上海宏石,型号SLAN-96P)进行荧光定量PCR分析。CMV-DNA测定试剂盒(荧光PCR法,货号:Z-0D-0022-02AT-100)购自上海之江生物科技股份有限公司。Ficoll淋巴细胞分离液购自上海易佰聚生物。

1.3 方法

1.3.1 标本制备 用EDTA-K₂抗凝真空采血管抽取静脉血4mL,轻轻混匀。(1)PBMCs分离:取抗凝全血1mL置于灭菌离心管中,加入生理盐水1mL轻摇混匀。取另一灭菌离心管,加入3mL Ficoll淋巴细胞分离液,将稀释好的全血用加样器缓慢加入加有淋巴细胞分离液的试管中,应用水平离心机,1 000×g离心20 min。吸取白细胞层,加入到1.5mL离心管中。(2)血浆制备:取抗凝全血1mL置于灭菌离心管中3 000 r/min离心5 min,提取血浆。

1.3.2 CMV核酸提取 制备好的PBMCs 12 000 r/min离心5 min,去上清液,沉淀加入50 μL DNA提取液,充分混匀,100 °C恒温处理(10±1)min。12 000 r/min离心5 min,上清液即为模板,留取备用。吸取50 μL血浆,加入50 μL提取液,充分混匀,100 °C恒温处理(10±1)min。12 000 r/min离心

△ 通信作者,E-mail:sujr2011@163.com。

5 min, 上清液即为模板, 留取备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 PCR 反应总体积 40 μL : PCR 反应液 36 μL , Tag 酶 0.4 μL , 模板 4.0 μL 。取 PCR 反应管 n 个($n = \text{标本数} + 1$ 管阴性质控品 + 1 管临界阳性质控品 + 4 管定量标准品), 分别加入处理好的标本、阴性质控品、阳性质控品和定量标准品上清液各 4 μL , 8 000 r/min 离心数秒, 放入仪器样品槽。PCR 循环条件: 37 °C 2 min; 94 °C 2 min; 93 °C 15 s, 60 °C 60 s, 40 个循环。

1.3.4 结果判读 若检测数值 $< 250 \text{ copy/mL}$, 则标本的 CMV-DNA 载量低于检测下限; 若检测数值 $< 10^3 \text{ copy/mL}$, 结果为阳性, 定量数值仅供参考; 若检测数值为 $10^3 \sim 10^7 \text{ copy/mL}$, 则报告 CMV-DNA 载量的确切数值; 若检测数值 $> 10^7 \text{ copy/mL}$, 则将样品提取的 DNA 用阴性质控品稀释到线性范围后再检测。

1.3.5 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 动态变化趋势分析 分别检测 48 例患者血浆 CMV-DNA 载量峰值前后各 4 周的 CMV-DNA 载量, 共计 9 个时间节点。

1.4 统计学处理 采用 PASW Statistics27 软件进行数据分析。计数资料以频数或百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验。计量资料采用 Kolmogorov-Smirnov 检验, 非正态分布的计量资料以 $M(P_{25}, P_{75})$ 表示, 组间比较采用 Wilcoxon 符号秩检验。采用 Spearman 相关性分析血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量的相关性。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 定性结果比较 432 份检测标本中, 40 份标本两种标本类型定性结果不一致, 见表 1。其中血浆阳性而 PBMCs 阴性标本 5 份, 分别来源于 2 例 HSCT 术后 PBMCs 数量低于 $0.1 \times 10^9/\text{L}$ 的患者, 考虑其 PBMCs 中 CMV-DNA 为假阴性, 应以血浆结果作为参考。血浆阴性而 PBMCs 阳性标本 35 份, 其 PBMCs 中 CMV-DNA 载量在 $6.60 \times 10^2 \sim 6.88 \times 10^4$ 范围内。两种标本类型定性结果的符合率为 90.74%, 两种标本类型中病毒检出率差异有统计学意义 ($\chi^2 = 292.376, P < 0.001$)。

2.2 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 定量检测结果比较 432 份标本中, 血浆和 PBMCs 的 CMV-DNA 载量分别为 [$0(0, 2265)$] copy/mL 和 [$443(0, 33100)$] copy/mL, PBMCs 中 CMV-DNA 载量高于血浆 ($Z =$

-18.449, $P < 0.001$)。Spearman 相关性分析结果显示, 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量呈正相关 ($r = 0.890, P < 0.001$)。见图 1。

2.3 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 动态变化趋势分析 在 CMV-DNA 载量上升和下降阶段, PBMCs 中 CMV-DNA 载量均显著高于血浆中 CMV-DNA 载量 (P 均 < 0.001), 见表 2。血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量上升和下降趋势及达峰时间基本一致, 见图 2。25 例 CMV 感染患者中, -2 周、-1 周、峰值和 +1 周, 所有血浆和 PBMCs 标本 CMV-DNA 载量均为阳性。在 CMV-DNA 载量的上升阶段, -4 和 -3 周时, 血浆标本中分别有 9 份和 7 份标本 CMV-DNA 载量低于检测下限, 而 PBMCs 中, 仅有 1/25 份标本 CMV-DNA 载量低于检测下限。在病毒载量下降阶段, +2、+3 和 +4 周时, 血浆标本中分别有 2 份、9 份和 12 份标本 CMV-DNA 载量低于检测下限, 而 PBMCs 中, 分别有 1 份、2 份和 2 份标本 CMV-DNA 载量低于检测下限。

在 CMV-DNA 载量下降阶段, +1 周时, 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量分别下降 92.79% 和 68.77%, +2 周时, 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量分别下降 97.72% 和 97.44%, 第 1 周时, 血浆中 CMV-DNA 载量下降显著高于 PBMCs 中。见图 2D。

表 1 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 定性结果比较

标本类型	血浆(+)	血浆(-)	合计
PBMCs(+)	180	35	215
PBMCs(-)	5	212	217
合计	185	247	432

注: + 为阳性, - 为阴性。

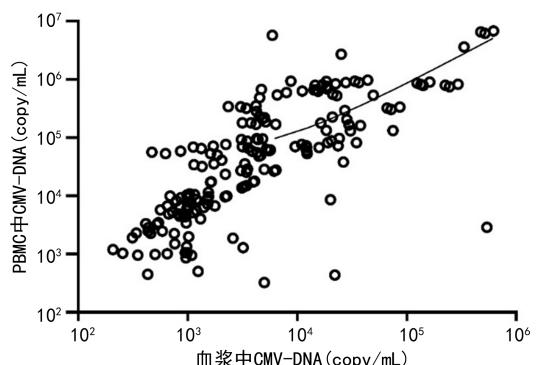
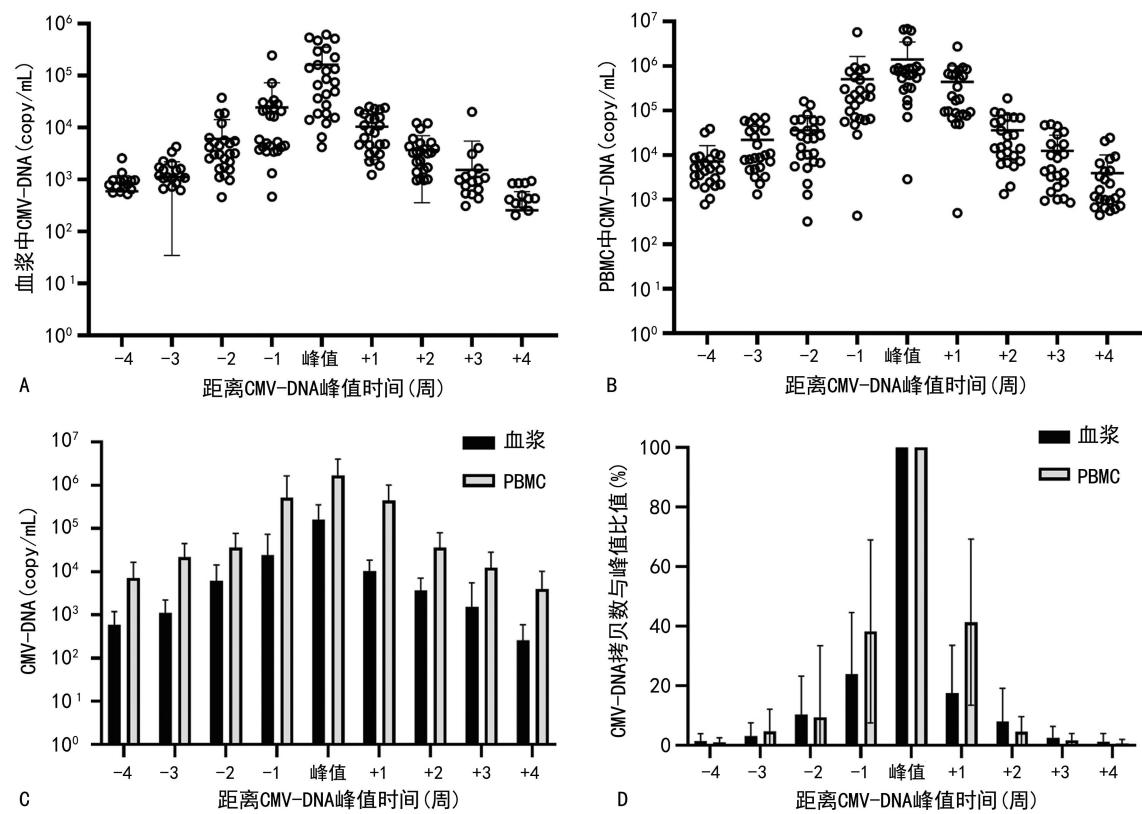


图 1 血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 定量结果分析

表 2 不同时间节点血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量比较 [$M(P_{25}, P_{75})$]

项目	血浆	PBMCs	Z	P
周数(周)				
-4	651(0, 958)	4 750(2 220, 8 495)	-18.449	<0.001
-3	1 060(0, 1 565)	8 790(4 780, 38 500)	-18.455	<0.001
-2	4 210(1 690, 9 295)	53 400(8 235, 108 000)	-18.455	<0.001
-1	5 910(4 005, 25 650)	207 000(65 700, 525 500)	-18.455	<0.001
峰值	74 800(18 650, 259 500)	767 000(329 500, 893 000)	-18.455	<0.001
+1	8 720(3 895, 19 500)	180 000(79 550, 671 000)	-18.455	<0.001
+2	3 260(1 210, 4 690)	15 100(7 045, 63 750)	-18.455	<0.001
+3	540(0, 1 115)	4 330(1 275, 17 650)	-17.676	<0.001
+4	0(0, 433)	1 190(665, 4 430)	-18.455	<0.001



注: A 为不同时间节点血浆中 CMV-DNA 载量; B 为不同时间点 PBMCs 中 CMV-DNA 载量; C 为不同时间点血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量比较; D 为不同时间点血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量与峰值比值。

图 2 不同时间节点血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量动态变化趋势分析

3 讨 论

人群在初次感染 CMV 后,通常表现为无症状潜伏感染状态,而当患者免疫功能低下,如应用免疫抑制剂等时,病毒会再次活化而导致严重感染。据研究报道,在 HSCT 后的患者中,CMV 感染所致病死率较高,仅次于移植抗宿主细胞病^[2,5]。CMV 感染早期临床症状不易被发现,诊断常需要依赖于临床实验室检测手段。目前,临幊上常用的免疫学检测方法包括 CMV 免疫球蛋白 G(IgG)抗体检测、CMV 免疫球蛋白 M(IgM)抗体检测等,但该方法受患者免疫功能、用药情况等影响,存在较高的假阴性率和假阳性率,且多用于评估移植前供者与受者的病毒携带状况,而非早期诊断^[6]。基于荧光定量 PCR 技术的 CMV-DNA 定量检测是测定病毒拷贝数最直接、最可靠的方法,可以早期诊断 CMV 感染,并对感染患者的病毒载量进行连续监测,提供临幊指导意义。

临幊上,用于 CMV-DNA 检测的标本类型包括血清、血浆、PBMCs 和全血等,不同的标本类型会导致检测结果存在较大的差异,且具有不同的临幊意义。本研究中,共纳入 48 例 HSCT 后患者,连续监测 9 周 CMV-DNA 载量,共得到 432 个检测数值。本研究对两种标本类型中 CMV-DNA 载量进行了定性分析、定量分析和动态变化趋势分析。定性结果显示,有 40 份标本两种标本类型呈现出不一致的结果。其中血浆阳性而 PBMCs 阴性标本 5 份,分别来源于 2 例 HSCT 后的患者,其 PBMCs 数量低于 $0.1 \times 10^9/L$,进行 PBMCs 分离时,白膜层较薄,考虑其 PB-

MCs 数量过少,CMV-DNA 为假阴性结果。此类标本可以考虑增加采血量来弥补 PBMCs 数量少的问题,但是增加采血量的同时也会给患者带来困扰,建议以血浆结果作为参考。血浆阴性而 PBMCs 阳性标本共有 35 份,PBMCs 中 CMV-DNA 载量在 $10^2 \sim 10^4$ copy/mL,呈低水平复制,可见当 CMV-DNA 载量较低时,PBMCs 检测具有更高的灵敏度。CMV 感染人体后,在纤维细胞中增殖,细胞核内出现嗜酸性包涵体,机体的细胞免疫功能对 CMV 感染的发生和发展起着重要作用。当病毒低水平复制时,血浆中没有足够能量的病毒核酸被检测出,可能出现 PBMCs 呈阳性,而血浆呈阴性的情况。血浆中检测到较高载量的病毒可以代表细胞或组织释放的游离 CMV-DNA^[7-8]。本研究定量结果显示,PBMCs 中 CMV-DNA 载量显著高于血浆,约是血浆中 CMV-DNA 载量的 10~100 倍,相关性分析显示二者呈正相关。该结果与 LIS-BOA 等^[9]的研究结果一致,在两种类型的标本中,CMV-DNA 载量存在显著相关性。有学者报道,实体器官移植和 HSCT 后的患者全血中 CMV-DNA 载量的中位数较血浆中高 10 倍^[10-11]。

此外,本研究还发现,血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量上升和下降趋势及达峰时间基本一致。由于 CMV 具有高度的细胞相关性,因此,在 PBMCs 和血浆两种标本类型中,同一时间点呈现出不一致的病毒载量。本研究中的各个时间点,血浆中 CMV-DNA 载量显著低于 PBMCs 中 CMV-DNA 载量。25 例 CMV 感染病例中,病毒载量峰值前后 1~2 周,由于

病毒载量较高,血浆和 PBMCs 所有标本中 CMV-DNA 载量均为阳性。在病毒载量上升的初始阶段和下降阶段,由于部分标本病毒载量较低,呈现 PBMCs 检测结果阳性而血浆检测结果为阴性的情况,提示在病毒复制期,与血浆标本比较,PBMCs 标本具有更高的灵敏度,可以在早期监测到病毒的感染情况,而在疾病恢复期,血浆中病毒载量下降更明显,能更早地反映疾病的转归。

本研究中,为了分析 CMV 载量的变化规律,将两种标本类型中 CMV-DNA 载量相对于峰值进行了标准化。在病毒载量下降阶段,+1 周时,血浆中 CMV-DNA 载量下降了 92.79%,显著高于 PBMCs,提示在病毒清除早期阶段,监测血浆中病毒载量能够较早地反映出疾病的转归和治疗的有效性。+2 周时,血浆和 PBMCs 中 CMV-DNA 载量下降均达到 97.00% 以上,提示在疾病恢复期,病毒载量在前两周下降明显。

PBMCs 作为外周血中重要的抗原呈递细胞,在许多病毒相关疾病的发生和发展中发挥着非常重要的作用。在病毒的潜伏阶段对 PBMCs 中的病毒核酸进行检测可以对疾病进行早期的诊断和发展评估。当病毒在 PBMCs 中增殖,必然会造成细胞的损伤裂解,病毒释放入血液,此时对血浆进行检测具有非常重要的意义^[12-14]。本研究也印证了 PBMCs 是病毒的重要载体,其内部的病毒核酸要比释放到血浆中的病毒载量更高。但由于其操作程序复杂,且受白细胞数量影响较大,一定程度限制了骨髓移植术后早期白细胞缺乏或使用抗病毒药物导致白细胞数量低时的检测,导致可能出现假阴性结果^[15-16]。因此血浆及 PBMCs 标本类型相结合,两种标本类型同时检测可以有效地避免漏检和误检,更好地提高检出率,为临床诊断提供更有力的依据。

对于 CMV 感染的诊断与监测,不同标本类型中 CMV-DNA 载量呈现出疾病病程差异性和患者个体差异性,哪种疾病应该采用哪种标本类型,以及 CMV-DNA 定量检测在不同疾病中具有诊断意义的最佳截断值都尚在探讨中,这还需要临床医生与检验科人员进一步沟通合作,根据疾病的病程和患者的具体情况合理选择标本类型。

参考文献

- [1] MONDAY L M, KERI V, CHANDRASEKAR P H. Advances in pharmacotherapies for cytomegalovirus infection: what is the current state of play[J]. Expert Opin Pharmacother, 2024, 25(6): 685-694.
- [2] HAKKI M, AITKEN S L, DANZIGER-ISAKOV L, et al. American Society for Transplantation and Cellular Therapy Series: #3-prevention of cytomegalovirus infection and disease after hematopoietic cell transplantation [J]. Transplant Cell Ther, 2021, 27(9): 707-719.
- [3] XU Y, LV Y, LIN M, et al. A novel multiplex real-time PCR assay for the detection of cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, herpes simplex virus 1/2 and strategies for application to blood screening [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2024, 109(1): 116234.
- [4] HUNTER-SCHLICHTING D N, VOGEL R I, GELL-ER M A, et al. Quantification of low-level human cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNAemia by digital PCR [J]. J Virol Methods, 2024, 325: 114876.
- [5] 王朴英,赵翔宇,成娟,等.异基因造血干细胞移植后巨细胞病毒感染预防治疗的进展[J].中国感染与化疗杂志,2022,22(4):515-520.
- [6] 陈玉,李莉,吴伟伟,等.母体携带 HCMV-DNA 对母乳喂养 HCMV 感染患儿生长发育与细胞免疫和体液免疫的影响[J].中华医院感染学杂志,2024,34(7):1086-1090.
- [7] SUGANDA S, TANG L, CARR J, et al. Comparative evaluation of whole blood versus plasma for quantitative detection of cytomegalovirus using an automated system [J]. Diagn Microbiol Infect Dis, 2016, 85(1): 23-25.
- [8] BABADY N E, CHENG C, CUMBERBATCH E, et al. Monitoring of cytomegalovirus viral loads by two molecular assays in whole-blood and plasma samples from hematopoietic stem cell transplant recipients [J]. J Clin Microbiol, 2015, 53(4): 1252-1257.
- [9] LISBOA L F, ASBERG A, KUMAR D, et al. The clinical utility of whole blood versus plasma cytomegalovirus viral load assays for monitoring therapeutic response [J]. Transplantation, 2011, 91(2): 231-236.
- [10] COSTA C, SIDOTI F, MANTOVANI S, et al. Comparison of two molecular assays for detection of cytomegalovirus DNA in whole blood and plasma samples from transplant recipients [J]. New Microbiol, 2016, 39(3): 186-191.
- [11] DIOVERTI M V, LAHR B D, GERMER J J, et al. Comparison of standardized cytomegalovirus (CMV) viral load thresholds in whole blood and plasma of solid organ and hematopoietic stem cell transplant recipients with CMV infection and disease [J]. Open Forum Infect Dis, 2017, 4(3): ofx743.
- [12] EIBENSTEINER F, MESSNER I, UHL P, et al. The association of Torque Teno viral load with CMV and BKV infection in pediatric and adolescent kidney transplant patients [J]. J Clin Virol, 2024, 172: 105673.
- [13] FUKUDA Y, TORII Y, IWATA KI, et al. Comparison of whole blood and plasma for monitoring cytomegalovirus and Epstein-Barr virus [J]. New Microbiol, 2024, 47(1): 52-59.
- [14] LJUNGMAN P, DE LA CAMARA R, ROBIN C, et al. Guidelines for the management of cytomegalovirus infection in patients with hematological malignancies and after stem cell transplantation from the 2017 European Conference on Infections in Leukaemia (ECIL 7) [J]. Lancet Infect Dis, 2019, 19(8): e260-e272.
- [15] RAZONABLE R R, HUMAR A. Cytomegalovirus in solid organ transplant recipients: Guidelines of the American Society of Transplantation Infectious Diseases Community of Practice [J]. Clin Transplant, 2019, 33(9): e13512.
- [16] LAZZAROTTO T, CHIEREGHIN A, PIRALLA A, et al. Kinetics of cytomegalovirus and Epstein-Barr virus DNA in whole blood and plasma of kidney transplant recipients: implications on management strategies [J]. PLoS One, 2020, 15 (8): e0238062.