

探讨两种方法联检对巨细胞病毒感染的临床诊断价值

刘龙梅 何雨峰 武建才 赵克斌

作者单位:030001 太原市,山西医科大学第一附属医院检验科

通讯作者:赵克斌, E-mail: syyyjykb@sina.com

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)是一种 β 属疱疹病毒组 DNA 病毒,由于感染的细胞肿大,并具有巨大的核内包涵体,亦称细胞包涵体病毒。CMV 可侵犯全身各器官,导致各种临床症状及体征,如肝脏损害、呼吸系统损害、血液系统改变等。另外,CMV 感染还可以导致早产、小于胎龄儿,并能出现小头畸形、听力及智力损伤等后遗症。先天性 CMV 感染的病死率为 10%~30%,幸存者 90%以上可遗留不同程度的神经系统后遗症^[1]。对于 CMV 感染的诊断在临床上无法独立完成,必须依靠实验室检测。因此,早期、快速诊断 CMV 活动性感染对降低病死率、避免过度免疫抑制和指导抗病毒治疗都有十分重要的意义。本文研究采用实时荧光定量-PCR 检测患儿尿液 CMV,同时用 ELISA 法检测患儿血清 CMV-IgM,探讨两种方法联合检测在 CMV 感染诊断中的临床应用价值。

1 资料与方法

1.1 临床资料 选择 2011 年 2 月至 2011 年 7 月我院儿科及新生儿病房患儿 53 例,其中男 31 例,女 22 例,年龄 3 天~8 岁。病例选择符合下列标准:①新生儿有小头畸形、黄疸、肝脾肿大及紫癜。②单核细胞增多症。③免疫缺陷宿主,出现发热、肺炎、以及其他 CMV 感染症状。具有上述三种症状之一,且 CMV-Ab(IgM)和 PCR-CMV-DNA 任意一项阳性即诊断为 CMV 活动性感染^[2]。血液标本进行 CMV-Ab(IgM)检测,同时采集尿液进行 PCR-CMV-DNA 检测。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 采用奥地利 Anthos 公司 HT-2 型全自动酶标仪检测 CMV-Ab(IgM),试剂盒为北京现代高达生物技术有限公司产品。实时荧光定量-PCR 采用美国 ABI Prism 7000 检测,试剂盒为中山达安基因有限公司产品。

1.2.2 血液 CMV-Ab(IgM)检测 患者清晨空腹采集静脉血 2 ml,以离心半径 10 cm,3500 r/min 离心 10 min 分离血清;严格按照试剂盒说明书进行操作。

1.2.3 尿液 PCR-CMV-DNA 检测 取患儿晨尿 1 ml 于 1.5 ml 的无菌离心管中,以离心半径 10 cm,12 000 r/min 离心 5 min,弃上清,沉淀加 50 μ l DNA 提取液打匀。100 $^{\circ}$ C 保温 10

min(误差不超过 1 min)。以离心半径 10 cm,12 000 r/min 离心 5 min,取上清液(含病毒 DNA)5 μ l 做 PCR 扩增。循环条件:93 $^{\circ}$ C 2 min 预变性,然后按 93 $^{\circ}$ C 45 s,55 $^{\circ}$ C 60 s,先做 10 个循环,最后按 93 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,做 30 个循环。

1.2.4 统计学处理 采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行统计分析,阳性率的比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种方法检测结果比较 尿液 PCR-CMV-DNA 与血液 CMV-Ab(IgM)检测结果见表 1。两种方法检测阳性率差异有统计学意义($\chi^2 = 9.38, P < 0.05$)。

表 1 血液 CMV-Ab(IgM)和尿液 PCR-CMV-DNA 的检测结果比较

CMV-Ab(IgM)	PCR-CMV-DNA		合计
	阳性	阴性	
阳性	6	13	19
阴性	34	0	34
合计	40	13	53

2.2 两种检测方法单独及联合检测阳性率结果 CMV-Ab(IgM)检测的阳性率为 35.8%,PCR-CMV-DNA 检测的阳性率为 75.5%。两种方法联检阳性率可达 100%。见表 2。

表 2 血液 CMV-Ab(IgM)和尿液 PCR-CMV-DNA 的检测结果

项目	例数	阳性例数	阴性例数	阳性率(%)
CMV-Ab(IgM)	53	19	34	35.8
PCR-CMV-DNA	53	40	13	75.5
联合检测	53	53	0	100.0

3 讨论

CMV 感染的诊断主要依靠实验室检查,因此实验方法选择至关重要。目前用于 CMV 检测的方法有:病毒分离培养、血清抗体检测、病毒抗原检测、细胞学检查、病毒 DNA 的检测。病毒培养为检测 CMV 的金标准,但其耗时较长,技术要求高,使其在临床应用受到限制。血清学检测虽然简便,但不适

于早期检测及对 CMV 感染状况的评价^[3]。

ELISA 是应用最多的检测技术之一,用 ELISA 法检测的 CMVlgM 抗体一直被作为活动性 CMV 感染的诊断指标,在感染后 5 d 内出现,持续 3~6 个月,多代表近期活动性感染,IgM 抗体阴性可能是由于感染最初阶段抗体尚未出现,或感染后期抗体已经消失。同时,IgM 阳性不是原发感染的可信指标,不能作为诊断 CMV 的直接证据,因为风湿因子、既往感染的残留和疱疹病毒属交叉反应均能造成假阳性^[4]。另外,其不能作为判断药物疗效和患者预后情况的定量指标。本文研究 ELISA 法阳性检出率仅为 35.8%,与唐娟等^[5]人的研究结果相似。ELISA 法阳性检出率较低的原因可能是 IgM 的量不仅与病毒负荷有关,还与患者免疫功能状态有关,CMV 感染患儿多有免疫功能低下,也影响检测的敏感性和特异性。

实时荧光定量-PCR 基本自动化,排除了人为因素对检测的干扰,可以做到早期检测及量化,因此,可以用于判断病毒的活动性,对评价抗病毒治疗疗效有着重要的意义,弥补了病毒分离与抗原、抗体检测的部分不足^[6]。实时荧光定量-PCR 法阳性率 75.5%,比 ELISA 法阳性率(35.8%)高,两者比较差异有统计学意义($\chi^2=9.38, P<0.05$),说明实时荧光定量-PCR 法可以提高患儿 CMV 活动性感染的检出率。

本文研究结果中 PCR-CMV-DNA 阳性检出率高达 75.5%,比唐娟等^[5]的研究结果(61.87%)高,原因可能为本实验选取的病例都是临床确诊 CMV 活动性感染的病例,且临床症状明显,所以阳性率较高。与徐锦等^[7](74.5%)和王岩等^[8](75.1%)等的研究结果相似。ELISA 检测 19 例阳性者中,PCR-CMV-DNA 检测 13 例为阴性,原因可能是病毒不复制而抗体还未完全消失,这部分患者临床症状较轻且实验室相关指标变化亦不明显。而 PCR-CMV-DNA 阳性 ELISA 阴性的则有 34 例,表明 PCR-CMV-DNA 法能更早检测到病毒,与 Bhatia 等^[9]研究结果一致。同时由于儿科患者的特殊性,血液标本留取困难,而 PCR-CMV-DNA 法只需留取尿液,简单无创伤,更易被患儿及家属接受。

另外,本文研究发现,PCR-CMV-DNA 检测 13 例阴性者中,ELISA 法全部阳性,说明 ELISA 法可作为 PCR-CMV-DNA 检测方法的补充实验,两者联检阳性率可高达 100.0%,PCR-CMV-DNA 法测定病毒含量,反映病毒在体内复制情况,可用来诊断 CMV 感染及评价病情和疗效,ELISA 法检测体内免疫系统在清除病毒过程中产生的保护性抗体,可诊断 CMV 感染,一定程度上反应机体的感染病程,也可鉴别原发、继发感染,但 CMV-Ab(IgM)和 PCR-DNA 其中一项阳性即诊断为 CMV 活动性感染^[10]。正因为两种实验方法所检测的目标物质及侧重点不同,所以两者可互相补充,联合检验,以提高 CMV 的诊断阳性率。

4 参考文献

- 1 薛辛东,主编.儿科学.北京:人民卫生出版社,2002,223-224.
- 2 中华医学会儿科学分会感染消化组,《中华儿科杂志》编委会.巨细胞病毒感染诊断方案.中华儿科杂志,1999,37:441.
- 3 Bhatia J, Shan BV, Mehta AP, et al. Comparing serology, antigenemia assay and polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplant patients. J Assoc Physicians India, 2004, 4 :297-300.
- 4 周君霞,何林.荧光定量 PCR 技术在小儿尿液巨细胞病毒检测中的应用.中国热带医学,2007,7:717-718.
- 5 唐娟,李东明.尿巨细胞病毒定量检测在婴儿巨细胞病毒感染诊治中的意义.西南国防医药,2010,20:53-54.
- 6 Yakushiji K, Condo H, Kamezaki K, et al. Monitoring of cytomegalovirus reactivation after allogeneic stem cell transplantation comparison of an antigenemia assay and quantitative real-time PCR. Bone Marrow Transplant, 2002, 29:599-606.
- 7 徐锦,陈剑平,丁韵珍,等.尿巨细胞病毒定量检测在巨细胞病毒感染诊断中的意义.实用儿科临床杂志,2006,21:596-597.
- 8 王岩,郭晓英,李佳丹,等.荧光定量 PCR 法在检测 246 例小儿巨细胞病毒感染中的应用.黑龙江医药科学,2010,33:16-17.

(收稿日期:2011-07-25)

(本文编辑:张志成)

消 息

中国医师协会检验医师分会网站信息

中国医师协会检验医师分会于 2004 年底创建中国医师协会检验医师分会网站,至今已在互联网上推出 7 年了,欢迎广大医务工作者浏览网站。本网站目前属于非赢利性网站,建立的宗旨是加强检验与临床之间的合作,为检验医师与临床医师提供一个交流的平台,推动检验医师国际间的交流,促进国内行业的发展,服务于广大医务工作者和患者。

本网站的中文实名为:中国医师协会检验医师分会

英文域名为:www.cmdal.org;www.cmdal.com