

β_2 微球蛋白在人巨细胞病毒先天性感染诊断中的价值

华咏艳 于俊才 曹勤

作者单位: 210017 江苏南京, 南京中医药大学第二附属医院检验科(华咏艳)

210017 江苏南京, 江苏省第二中医院检验科(于俊才、曹勤)

通信作者: 曹勤, Email: 2083267303@qq.com

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7151.2019.02.016

【摘要】 目的 探究 β_2 微球蛋白(β_2 -MG)在人巨细胞病毒(HCMV)先天性感染诊断中的应用价值。方法 采集 2017 年 1 月—2018 年 10 月在南京中医药大学第二附属医院新生儿科住院的 136 例婴幼儿的尿液及血液标本,采用荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测尿液中 HCMV 病毒核酸(HCMV-DNA)拷贝数;采用散射比浊法检测血液中 β_2 -MG 水平。根据尿液荧光定量 PCR 检测结果将婴幼儿分为 HCMV 先天性感染组和非感染组,其中先天性感染组根据其是否有典型临床症状又分为症状性先天性感染组和非症状性先天性感染组,比较各组间 HCMV-DNA 拷贝数和 β_2 -MG 水平。采用受试者工作特征曲线(ROC)分析 HCMV-DNA 拷贝数和 β_2 -MG 对新生儿 HCMV 先天性感染的诊断价值。结果 136 例婴幼儿中, HCMV 先天性感染组 76 例,其中症状性先天性感染组 36 例,非症状性先天性感染组 40 例;非感染组 60 例。症状性先天性感染组 HCMV 病毒拷贝数明显高于非症状性先天性感染组(拷贝数/mL: $307\ 786 \pm 133\ 626$ 比 $18\ 934 \pm 5\ 688$, $P < 0.01$)。HCMV 先天性感染组 β_2 -MG 明显高于非感染组(mg/L: 3.143 ± 0.230 比 2.122 ± 0.130 , $P < 0.01$);症状性先天性感染组 β_2 -MG 水平明显高于非症状性先天性感染组(mg/L: 4.413 ± 0.291 比 1.964 ± 0.144 , $P < 0.01$)。HCMV-DNA 拷贝数诊断症状性先天性感染的 ROC 曲线下面积(AUC)为 0.644 2, β_2 -MG 诊断症状性先天性感染的 AUC 为 0.949 2。HCMV-DNA 拷贝数、 β_2 -MG 诊断症状性先天性感染的敏感度分别为 61.54%、88.46%,特异度分别为 67.86%、89.29%。结论 新生儿血液中 β_2 -MG 水平和尿液中 HCMV-DNA 拷贝数在 HCMV 先天性感染诊断中具有明显的优势,可为抗病毒治疗干预提供理论基础。

【关键词】 人巨细胞病毒; 先天性感染; β_2 微球蛋白

Diagnostic value of β_2 microglobulin in infants with congenital infection of human cytomegalovirus

Hua Yongyan, Yu Juncai, Cao Qin. Department of Laboratory, the Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210017, Jiangsu, China (Hua YY); Department of Laboratory, the Second Chinese Medicine Hospital of Jiangsu Province, Nanjing 210017, Jiangsu, China (Yu JC, Cao Q)

Corresponding author: Cao Qin, Email: 2083267303@qq.com

【Abstract】 Objective To investigate the application value of β_2 microglobulin (β_2 -MG) in the diagnosis of infants with congenital infection of human cytomegalovirus (HCMV). **Methods** From January 2017 to October 2018, the urine and blood specimens from 136 infants and young children admitted in the Department of Neonatology, Second Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine were collected. The fluorescence quantitative polymerase chain reaction (PCR) was used to detect HCMV-DNA copy number in urine; scatter nephelometry was used to detect β_2 -MG level in blood. According to the urine fluorescence quantitative PCR test results, the infants were divided into HCMV congenital infection group and non-infection group. Among them, the congenital infection group was subdivided into a symptomatic congenital infection group and a non-symptomatic congenital infection group according to whether they had typical clinical symptoms or not, and the HCMV-DNA copy number and β_2 -MG level were compared between the above various groups. Finally, the receiver operating characteristic curve (ROC) was applied to analyze the diagnostic values of HCMV-DNA copy number and β_2 -MG level for infant HCMV congenital infection. **Results** There were 76 cases of HCMV congenital infection in 136 infants, including 36 cases of symptomatic congenital HCMV infection, 40 cases of non-symptomatic congenital HCMV infection, and 60 cases of non-infection. The HCMV virus copy number was significantly higher

in the symptomatic congenital infection group than that in the non-symptomatic congenital infection group (copies/mL: $307\,786 \pm 133\,626$ vs. $18\,934 \pm 5\,688$, $P < 0.01$). The β_2 -MG level of HCMV congenital infection group was significantly higher than that of non-HCMV infection group (mg/L: 3.143 ± 0.230 vs. 2.122 ± 0.130 , $P < 0.01$); the level of β_2 -MG in the symptomatic congenital infection group was significantly higher than that in the non-symptomatic congenital infection group (mg/L: 4.413 ± 0.291 vs. 1.964 ± 0.144 , $P < 0.01$). The area under the ROC curve (AUC) with HCMV-DNA copy number for the diagnosis of symptomatic congenital infection was 0.644 2, and the AUC of β_2 -MG for the diagnosis of symptomatic congenital infection was 0.949 2. The sensitivity of HCMV-DNA copy number and β_2 -MG for the diagnosis of symptomatic congenital HCMV infection was 61.54% and 88.46%, respectively, and the specificity was 67.86% and 89.29%, respectively. **Conclusion** The infant copy number of HCMV-DNA in urine and the level of β_2 -MG in blood have obvious advantages in the diagnosis of HCMV congenital infection, which can provide a theoretical basis for antiviral therapy intervention.

【Key words】 Human Cytomegalovirus; Congenital infection; β_2 microglobulin

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 感染在世界范围内普遍存在, 一般而言 HCMV 感染率与经济发展水平呈负相关, 欧美等发达国家感染率约为 80%~90%, 而发展中国家感染率高达 100%^[1]. HCMV 可通过胎盘垂直传播感染胎儿引起胎儿先天性感染, 研究显示, 孕期感染 HCMV 导致先天性感染的发生率为 15%~45%^[2]. HCMV 先天性感染患儿可表现为多种临床症状, 包括小头畸形、脑室周钙化、感音神经性耳聋、紫癜、黄疸、肝炎、肺炎、肾炎等. HCMV 先天性感染根据病毒在体内的复制状态分为活动性感染和潜伏感染; 根据是否有临床症状可将先天性感染分为症状性先天感染和非症状性先天感染, 症状性先天感染需根据后遗症的严重程度决定是否需采取抗病毒治疗. 由于现在常用的 HCMV 治疗药物 (如更昔洛韦等) 多存在毒副作用, 使用需谨慎. 因此, 先天性感染还需要区分活动性感染与潜伏感染.

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择 2017 年 1 月—2018 年 10 月本院新生儿科住院患儿作为研究对象. 本研究符合医学伦理学标准, 对患儿采取的检测得到过患儿监护人的知情同意.

1.2 仪器与试剂 ABI 7300Plus 定量 PCR 系统 (Life Technologies 公司), 试剂为 CMV-DNA 检测试剂盒 (达安基因公司); 西门子 BN II 特定蛋白分析仪, 试剂盒为西门子 β_2 微球蛋白 (β_2 -microglobulin, β_2 -MG) 测定试剂盒; DT5-4B 低速台式离心机 (北京时代北利离心机有限公司).

1.3 检测方法 采用带惰性分离胶的真空采血管分别抽取新生儿的空腹静脉血 4 mL, 静置 10 min, 4 000 r/min 离心 5 min (离心半径 10 cm), 分离血清, $-20\text{ }^\circ\text{C}$ 保存. 清洁患儿外阴, 用无菌尿液收集袋收

集新生儿尿液 3~5 mL 立即送检.

1.3.1 HCMV 病毒核酸 (HCMV-DNA) 检测 采用荧光定量聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 检测患儿尿液中 HCMV-DNA, 按试剂盒说明书操作: 取 2 mL 尿液于离心管中, 12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 10 cm), 弃上清. 在沉淀中加入 DNA 提取液 100 μL , $100\text{ }^\circ\text{C}$ 孵育 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min (离心半径 10 cm) 后取上清 5 μL 作为 PCR 模板. PCR 条件为 $94\text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min, $94\text{ }^\circ\text{C}$ 变性 40 s, $55\text{ }^\circ\text{C}$ 、40 s, 共 40 个循环. 根据阳性参考品 CT 值制备标准曲线, 并计算样本中 HCMV 病毒拷贝数. 以无菌水作为阴性对照检测 20 次, 计算均值及标准差, 以均数加 20 倍标准差为阳性检测临界值.

1.3.2 β_2 -MG 水平检测 采用散射比浊法检测患者血清 β_2 -MG 水平.

1.4 统计学方法 采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 组间均值比较采用 t 检验. $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义. 采用受试者工作特征曲线 (receiver operating characteristic curve, ROC) 分析 HCMV-DNA 和 β_2 -MG 单项检测效能并确定临界值, ROC 曲线下面积 (area under curve, AUC) > 0.5 为有诊断意义.

2 结果

2.1 一般资料 共 136 例患儿. 其中男性 62 例, 女性 74 例; 平均年龄 (16 ± 9.2) d. 患儿性别、年龄比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$). 先天性感染组 76 例, 非感染组 60 例. 先天性感染患儿中症状性先天性感染组 36 例, 非症状性先天性感染组 40 例.

2.2 HCMV 拷贝数 症状性先天性感染组 HCMV 拷贝数明显高于非症状性先天性感染组 (拷贝数/mL: $307\,786 \pm 133\,626$ 比 $18\,934 \pm 5\,688$, $P < 0.01$), 与国外研究结果一致, 提示病毒拷贝数的高低能在一定程度上预示是否会发生症状性感染. 同时

40例非症状性先天性感染组患儿中,有10例(占25.0%)尽管病毒拷贝数已超过20 000拷贝数/mL,但仍无相应临床表现;36例症状性先天性感染组患儿中,有7例(占19.44%)尽管病毒拷贝数低于300拷贝数/mL,但却出现临床症状。再次证实了HCMV拷贝数在判断是否发生症状性感染以及是否给予抗病毒治疗的策略制定上存在缺陷。见图1。

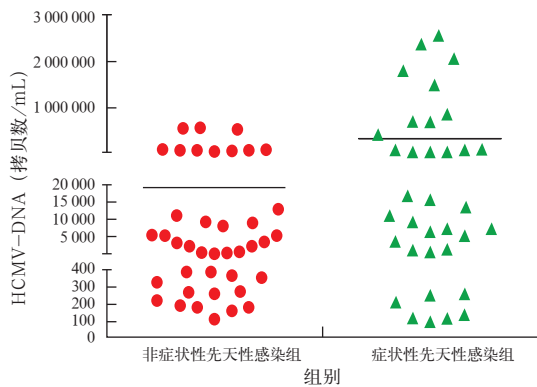


图1 非症状性先天性感染组与症状性先天性感染组的HCMV-DNA拷贝数比较

2.3 β_2 -MG含量 HCMV先天性感染组血清 β_2 -MG含量明显高于非感染组(mg/L: 3.143 ± 0.230 比 2.122 ± 0.130 , $P < 0.01$)。见表1,图2。症状性先天性感染组 β_2 -MG水平明显高于非症状性先天性感染组(mg/L: 4.413 ± 0.291 比 1.964 ± 0.144 , $P < 0.01$)。见表2,图3。非感染组血清 β_2 -MG水平较非症状性感染组高(mg/L: 2.122 ± 0.130 比 1.964 ± 0.144 , $P < 0.01$)，这是由于血清 β_2 -MG含量的变化还受其他因素干扰,如其他原因所致肾炎、肺炎等。

表1 先天性感染组与非感染组血清 β_2 -MG水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	β_2 -MG (mg/L)
先天性感染组	76	3.143 ± 0.230^a
非感染组	60	2.122 ± 0.130

注:与非感染组比较,^a $P < 0.01$

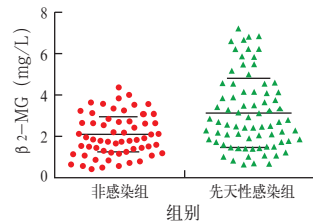


图2 先天性感染组与非感染组的 β_2 -MG水平比较

表2 症状性先天性感染组与非症状性先天性感染组血清 β_2 -MG水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	例数(例)	β_2 -MG (mg/L)
症状性先天性感染组	36	4.413 ± 0.291^a
非症状性先天性感染组	40	1.964 ± 0.144

注:与非症状性先天性感染组比较,^a $P < 0.01$

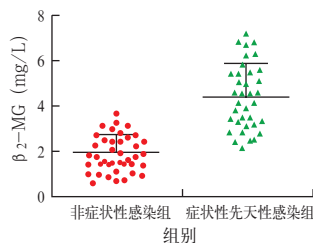


图3 症状性先天性感染组与非症状性先天性感染组的血清 β_2 -MG水平比较

2.4 HCMV-DNA拷贝数和 β_2 -MG对症状性先天性感染的诊断价值 ROC曲线分析显示,HCMV-DNA拷贝数、 β_2 -MG诊断症状性先天性感染的AUC分别为0.644 2和0.949 2。HCMV病毒核酸拷贝数作为诊断是否会发生症状性感染的指标,其临界值为 $>6 221$ 拷贝数/mL,敏感度为61.54%,特异度为67.86%;而 β_2 -MG作为诊断是否会发生症状性感染的指标,其临界值为 >2.935 mg/L,敏感度为88.46%,特异度为89.29%。见表3,图4。

表3 HCMV-DNA拷贝数和 β_2 -MG诊断症状性先天性感染的价值

检测项目	AUC	标准误	P值	临界值
HCMV-DNA	0.644 2	0.077 83	0.069	$> 6 221$ 拷贝数/mL
β_2 -MG	0.949 2	0.026 45	< 0.001	> 2.935 mg/L

检测项目	敏感度(%)	特异度(%)	95%CI
HCMV-DNA	61.54	67.86	0.491 7 ~ 0.796 8
β_2 -MG	88.46	89.29	0.897 3 ~ 1.001 0

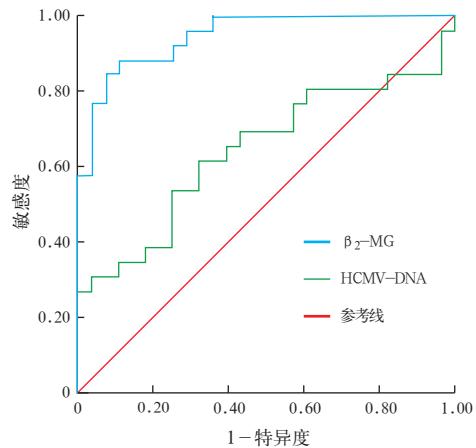


图4 HCMV-DNA拷贝数和 β_2 -MG诊断症状性先天性感染的ROC曲线

3 讨论

我国HCMV先天性感染十分常见,新生儿发病率约为1%,出生时早期诊断显得尤为重要。目前针对HCMV先天性感染的诊断主要依据体液(尤其是尿液)样本中HCMV拷贝数,主要采用荧光定量法检测病毒核酸。但临床实际遇到的困难是,有些患儿即使尿液中病毒拷贝数较高,却仍不表现为症状性感染;而有些患儿尽管尿液中病毒拷贝数不高,但却表现出严重的HCMV感染症状。有些症状很容易被观察到,还有许多表现为渐进性(如感音神经性耳聋),早期很难预测,最终是否会出现严重的后遗症由病毒对各组织器官的损害程度决定。

HCMV感染的实验室诊断方法主要包括病毒分离、PCR、抗原血症等^[3],而能够用于临床实际

诊断 HCMV 活动性先天性感染主要为 pp65 抗原血症、实时 PCR 酶联免疫吸附试验 (enzyme linked immunosorbent assay, ELISA) 检测病毒特异免疫球蛋白 G (IgG)、免疫球蛋白 M (IgM)。pp65 抗原血症采用间接免疫荧光法检测患者血液中单核细胞是否存在 HCMV pp65 抗原,该方法耗时约 4 h,且结果观察依赖于操作人员的经验。荧光定量 PCR 是最近新发展的一项快速检测 HCMV 的方法,可以定量样本中病毒的含量。HCMV 先天性感染患儿尿液中的病毒滴度与患儿是否发生症状性感染呈正相关^[4]。IgG 只能证明存在感染,而判断是否为活动性感染需双份血清抗体含量 4 倍以上升高;IgM 阳性可诊断为活动性感染,但其阳性率极低,且受患者免疫状态的影响结果可出现假阴性。

有研究表明,新生儿尿液中 HCMV 拷贝数与患儿是否发生症状性感染之间有明显的相关性,病毒拷贝数越高,患儿发生症状性感染的概率越大^[5]。然而采用病毒拷贝数诊断 HCMV 症状性先天感染存在两个方面缺陷:① 部分患儿即使在出生时尿液中病毒拷贝数很高,但仍无相应临床症状^[6];② 病毒在尿路上皮细胞等细胞中大量复制时有时会产生非感染性颗粒(non-infectious envelope particles, NIEP),这是一些不包含病毒核酸的“假病毒”,通过荧光定量 PCR 无法测出^[7]。为解决这一临床实际问题,本研究通过加入非病毒特异性指标 β_2 -MG 以诊断 HCMV 症状性先天感染。有研究显示, HCMV 先天性感染患儿的血液中 β_2 -MG 呈高表达。

β_2 -MG 广泛分布于淋巴细胞和内皮细胞表面,机体出现炎症反应时 β_2 -MG 合成释放增多。HCMV 先天性感染可导致肺炎、肾炎等多种炎症^[8-9],同时上皮细胞、内皮细胞等是 HCMV 复制的主要宿主细胞,而病毒的包膜来自宿主细胞膜,其包膜上含有大量 β_2 -MG,当病毒在上皮细胞、内皮细胞等细胞中大量复制并以出芽方式释放时^[10-12],血液中 β_2 -MG 含量会显著升高。

临床用于治疗 HCMV 先天性感染的药物以更昔洛韦等核苷类似物为主,这些药物都存在一定毒副作用,对婴幼儿的发育会产生影响。这对早期干预治疗提出了更高的要求,非感染性包膜颗粒(non-infectious enveloped particles, NIEP)的存在使病毒核酸检测存在不确定性,故 HCMV 特异的蛋白指标是

理想选择,但由于目前临床应用 HCMV pp65 抗原血症检测耗时长,结果判断存在主观性,因此仅在极少数大型医院开展。本研究通过检测 HCMV 感染的非病毒特异性指标 β_2 -MG,发现 β_2 -MG 可以弥补核酸检测在敏感度和特异度上的缺陷,联合 β_2 -MG 检测可以较大程度地提高检测敏感度和特异度。

参考文献

- 1 Sun Z, Ceng X, Mao Z, et al. Diagnostic value of HCMV pp65 antigen detection by FCA for symptomatic and asymptomatic infection: compared to quantification of HCMV DNA and detection of IgM antibody in infants [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2009, 198(2): 107-112. DOI: 10.1007/s00430-009-0112-y.
- 2 Simoncini L. Diagnostic and prognostic value of human cytomegalovirus (HCMV) load and IgM antibody in blood of fetuses and newborns with congenital HCMV infection [J]. *J Clin Microbiol*, 1999, 12(2): 175.
- 3 中华医学会儿科学分会感染消化学组. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. *中华儿科杂志*, 1999, 37(7): 441. DOI: 10.3760/j.issn:0578-1310.1999.07.015.
- 4 Liu G, Hai R, Liu F. Detection of congenital cytomegalovirus in newborns using nucleic acid amplification techniques and its public health implications [J]. *Virol Sin*, 2017, 32(5): 376-386. DOI: 10.1007/s12250-017-4055-y.
- 5 Simonazzi G, Cervi F, Zavatta A, et al. Congenital cytomegalovirus infection: prognostic value of maternal DNAemia at amniocentesis [J]. *Clin Infect Dis*, 2017, 64(2): 207-210. DOI: 10.1093/cid/ciw700.
- 6 黄峥,姜新华,吴小明. 尿液巨细胞病毒核酸检测结合全血细胞计数在小儿巨细胞病毒感染诊断中的应用[J]. *浙江临床医学*, 2017, 19(11): 2108-2110.
- 7 Chan CK, Brignole EJ, Gibson W. Cytomegalovirus assemblin (pUL80a): cleavage at internal site not essential for virus growth; proteinase absent from virions [J]. *J Virol*, 2002, 76(17): 8667-8674. DOI: 10.1128/jvi.76.17.8667-8674.2002.
- 8 李弢,周姗姗,熊小丽,等. 早期血浆置换治疗重症婴儿巨细胞病毒感染胆汁淤积性肝病的疗效观察及相关分析[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2016, 23(6): 573-576. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.06.004.
- 9 鄢素琪,周姗姗,汤建桥,等. 早期干预胃扭转对巨细胞感染淤积性肝病婴儿发生肺炎及预后影响的前瞻性随机对照研究[J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2014, 21(4): 249-253. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2014.04.04.
- 10 Fang J, Luan J, Zhu G, et al. Detection of PCT and urinary β_2 -MG enhances the accuracy for localization diagnosing pediatric urinary tract infection [J]. *J Clin Lab Anal*, 2017, 31(5). DOI: 10.1002/jcla.22088.
- 11 Ohashi T, Tohjoh S, Matsumura Y, et al. Assessment of urinary ferritin, CEA and beta 2-MG determinations in patients with urinary tract malignancies [J]. *Hinyokika Kyo*, 1983, 29(2): 131-139.
- 12 Chen H, Li H. Clinical implication of cystatin C and β_2 -microglobulin in early detection of diabetic nephropathy [J]. *Clin Lab*, 2017, 63(2): 241-247. DOI: 10.7754/Clin.Lab.2016.160719.

(收稿日期: 2019-03-27)

(本文编辑: 张耘菲)