

血液病患者人巨细胞病毒感染的实验室诊断

苏芳, 张玉霞, 陈盼盼

(浙江省人民医院, 浙江 杭州 310014)

摘要: [目的] 探讨人巨细胞病毒(HCMV)在血液病患者中的感染状况。[方法] 共收集到血液病患者 136 例,应用酶联免疫吸附实验(ELISA)测定 HCMV-IgG 和 HCMV-IgM,应用实时荧光定量-多聚酶链反应(real-time PCR)和细胞免疫组化染色法检测外周血白细胞中 HCMV-DNA 和 HCMV-pp65 抗原。[结果] 血液病患者 HCMV-IgG、HCMV-IgM、HCMV-DNA 和 HCMV-pp65 阳性检出率分别为 99.3%、2.2%、18.8% 和 12.5%。而健康对照组除 HCMV-IgG 阳性率为 100%外,其余均为阴性。[结论] 血液病患者存在不同程度的 HCMV 感染。临床上开展 HCMV 抗原、抗体及核酸的检测,对血液病患者早期防治 HCMV 感染具有重要意义。

关键词: 人巨细胞病毒; 抗体; HCMV-DNA; HCMV-pp65

中图分类号: R733.7 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2013)08-0632-04

doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2013.08.B010

Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection in Patients with Hematological Malignancies

SU Fang, ZHANG Yu-xia, CHEN Pan-pan

(Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China)

Abstract: [Purpose] To investigate human cytomegalovirus (HCMV) infection in patients with malignant hematologic diseases. [Methods] Anti-HCMV antibody levels were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), HCMV-DNA by polymerase chain reaction (PCR) at the same time in 136 patients suffering from malignant hematologic diseases. HCMV-pp65 antigen was determined by immunohistochemistry staining (IHC). [Results] The positive rates of the HCMV-IgG, HCMV-IgM, HCMV-DNA and pp65 were 99.3%, 2.2%, 18.8% and 12.5% respectively. [Conclusions] HCMV infects patients with malignant hematologic diseases in varying degrees. Monitoring the pp65 antigen and anti-HCMV antibodies as well as HCMV-DNA plays important roles in the early prevention and treatment for malignant hematologic patients.

Subject words: human cytomegalovirus; antibody; HCMV-DNA; HCMV-pp65

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属 β 疱疹病毒亚科,是一个广泛传播的机会性致病病毒,在人群中血浆 IgG 抗体阳性率为 40%~100%^[1],通常情况下不会引起严重疾病,但在机体免疫系统受损或发育不成熟时 HCMV 原发或继发感染可引起严重的并发症甚至死亡。ELISA 法检测 HCMV 特异性抗体 IgM(HCMV-IgM)和 IgG(HCMV-IgG)是实验室诊断感染的敏感、特异、快速、简便、实用的方法之一,但应用于血液病患者的检测报道甚少。近年来荧光定量 PCR 方法应用广泛^[2],也可通过检测 HCMV-DNA 用于 HCMV 感染的诊断^[3-6]。为探讨血

液病患者的 HCMV 感染状况,我们应用 ELISA 法对 136 例血液病患者进行了 HCMV-IgM 和 HCMV-IgG 的测定,应用 PCR 法和细胞免疫组化染色法对其中 32 例患者的外周血白细胞进行 HCMV-DNA 和 HCMV-pp65 抗原检测,并对其临床意义作初步分析。

1 资料与方法

1.1 研究对象

血液病患者 136 例(血浆标本 179 份)均为 2010 年 4 月至 2013 年 4 月期间浙江省人民医院血液内科住院患者,均按 1987 年天津会议标准和 FAB 标准确诊并分型。其中男性 69 例,女性 67 例。

通讯作者: 苏芳, 技师, 本科; 浙江省人民医院检验科, 浙江省杭州市上塘路 158 号(310014); E-mail: 69262465@qq.com
收稿日期: 2013-06-18; **修回日期:** 2013-07-17

年龄 15~69 岁,平均年龄为(37.5±15.7)岁。包含急性淋巴细胞白血病 93 例,急性非淋巴细胞白血病 25 例,慢性粒细胞白血病 12 例,骨髓增生异常综合征 6 例。健康对照 30 名,均来自本院同期健康体检者,且各项体检指标正常,其中男性 15 名,女性 15 名。平均年龄为 23.1 岁(18~59 岁)。

1.2 检测方法

1.2.1 标本采集

空腹采集静脉抗凝血 5.0ml,常规分离血浆,分装后置-20℃保存待用。同时采用淋巴细胞分离液(天津市灏洋生物制品科技有限责任公司)制备外周血单个核细胞(PBMCs)备检。

1.2.2 HCMV-IgM 抗体测定

采用 IgM 抗体捕获法。将 1:101 稀释的血浆 100μl 加入已用抗人 μ 链单抗包被反应微孔,设空白、阴性对照、阳性对照和标准品孔。37℃孵育微孔板 60min,洗板 4~5 次后加 100μl 酶结合物;37℃孵育 60min,洗板 4~5 次后加色原/底物混合物 100μl;室温放置 20min,加入 100μl 硫酸终止反应,于 450nm 处测定 OD 值。样品 OD 值>1.2×Cut off 值为阳性。试剂由意大利 DIA.PRO Diagnostic Bioprobes 公司提供。

1.2.3 HCMV-IgG 抗体测定

采用间接 ELISA 法。将各浓度标准品和 1:101 稀释血浆 100μl 加入已包被 HCMV 抗原的反应微孔板,设立空白孔。37℃孵育 60min,洗板 4~5 次后加酶标记抗 IgG 抗体 100μl;37℃孵育 60min,洗板 4~5 次后加色原/底物 100μl;室温孵育约 20min,之后加入 100μl 硫酸终止反应,于 450nm 处测 OD 值。以标准品 OD 值和标准浓度绘制标准曲线,样品 HCMV-IgG 含量可从标准曲线查得。HCMV-IgG 浓度低于 0.5IU/ml 为阴性,高于 0.5IU/ml 为阳性。试剂由意大利 DIA.PRO Diagnostic Bioprobes 公司提供。

1.2.4 HCMV-DNA 测定

采用 Promega DNA 抽提试剂盒提取病毒 DNA。使用外周血白细胞标本提取 HCMV-DNA,之后加入 100μl DNA Rehydration Solution,65℃孵育 1h 溶解 DNA,-20℃保存备用。PCR 反应体系:40μl 混合反应液、3μl Taq 酶、2μl 模板,总体积 45μl;反应条件:93℃ 45s;55℃ 60s,10 cycles;93℃ 30s,55℃ 45s,30 cycles。阳性对照为 HCMV AD169 病毒株核酸样本。

1.2.5 HCMV-pp65 抗原检测

采用细胞免疫组化染色法。将外周血白细胞样本涂片后,晾干并用冷丙酮固定,经 3% 牛血清白蛋白(BSA)封闭,加抗 HCMV-pp65 单克隆抗体(Abcam 公司产品)室温反应 2h,加入 DAKO Evision 系统室温孵育 30min 后,DAB 显色 2min,终止反应,苏木素轻度复染,显微镜下观察结果并拍照。

1.3 统计学处理

应用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析,使用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HCMV-IgM 抗体

136 例血液病患者中,HCMV-IgM 抗体阳性 3 例,阳性率为 2.2%;30 名健康对照组 HCMV-IgM 抗体均阴性。

2.2 HCMV-IgG 抗体

136 例血液病患者中有 135 例 HCMV-IgG 抗体阳性,阳性率为 99.3%。30 名健康对照组 HCMV-IgG 抗体阳性率为 100%。

2.3 HCMV-DNA 检测

对 32 例血液病患者外周血白细胞进行了 HCMV-DNA 检测,其中有 6 例为 HCMV-DNA 阳性,阳性率为 18.8%。健康对照组 HCMV-DNA 均为阴性。

2.4 HCMV-pp65 分析

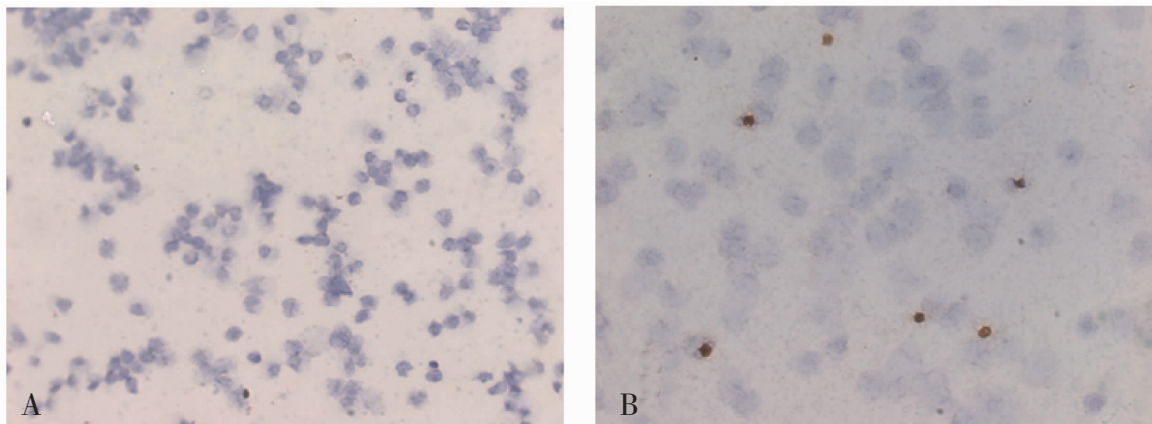
对 32 例血液病患者的外周血白细胞进行 HCMV-pp65 抗原检测,其中有 4 例为阳性,阳性率为 12.5%。健康对照组 HCMV-pp65 抗原均为阴性(Figure 1)。

2.5 HCMV-IgM、DNA 及 pp65 抗原检测法比较

与 ELISA 检测 HCMV-IgM 抗体法比较,PCR 法和细胞免疫组化染色法均具有较高的阳性检出率(Table 1)。

3 讨论

HCMV 在人群中的感染情况非常普遍,本研究的血液病患者组也可看到 HCMV-IgG 阳性率为 99.3%。正常人群感染 HCMV 后,该病毒以一种潜伏整合状态存在,通常是无症状或仅有轻微症状;而当



A: Healthy control;B:Malignant hematologic

Figure 1 The expression of HCMV-p65 in peripheral blood leukocytes by immunohistochemical staining

Table 1 The comparison of positive rate among 3 methods

Methods	Positive	Negative	Total	Positive rate(%)
HCMV-IgM (ELISA)	3	133	136	2.2
HCMV-DNA (PCR)	6	26	32	18.8 [#]
HCMV-p65 (IHC)	4	28	32	12.5 [*]
Total	13	187	168	5.4

*:compared with HCMV-IgM(ELISA), $P<0.01$;#:compared with HCMV-p65(IHC), $P<0.05$.

机体免疫机能受损或低下时，其复制、表达趋向活跃，从而引起感染、器官损伤，甚至危及生命。血液病患者的免疫系统功能大大低于正常人，易发生 HCMV 感染^[7]，因而血液病患者预防因 HCMV 感染而引起的各种并发症显得非常迫切。我们从抗体水平、核酸复制和病毒抗原表达三个角度入手，系统研究血液病患者 HCMV 感染状况。

HCMV 感染具有潜伏—激活的生物学特性，HCMV-IgG 的阳性表明有 HCMV 感染，可是并不能反映病毒是否处于激活状态^[8-10]。本研究 HCMV-IgG 的检测结果表明 HCMV 感染非常普遍，因此检测 HCMV-IgG 抗体对于血液病患者并不能诊断 HCMV 活跃性感染。夏吉荣等^[11]报道，检测 HCMV-IgM 可作为诊断 HCMV 活动性感染的指标。我们通过抗人 μ 链包被捕获法检测 HCMV-IgM，结果其阳性率并不高(2.2%)，这与血液病患者的免疫功能普遍低下有关。

HCMV-p65 抗原血症检测是目前公认的病毒活动性感染的重要指标，该方法要求标本须在 8h 内及时处理，否则 pp65 阳性细胞数将会减少，实验的

灵敏度将会降低^[12]。由于该检测方法操作繁杂且受到外周血白细胞数量、技术操作及人为因素影响难于标准化，在白细胞减少的患者中容易出现假阴性。在我们研究的 32 例血液病患者中，pp65 抗原检测阳性率低于 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测阳性率，这可能与患者白细胞数量低有关；也有可能与 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 和 HCMV-p65 抗原检测这两种方法首次出现阳性的时间有关，Solano 等^[13]认为前者较后者约早出现 7 天，而也有认为是 13.5 天^[14]。

本研究结果表明，血液病患者 HCMV 感染，可通过检测病毒核酸的复制、抗原表达和 HCMV 抗体的表达来反映出来。血液病患者由于普遍使用免疫抑制剂，仅仅靠检测抗 HCMV 抗体不能体现 HCMV 感染的真实情况，而 HCMV-DNA 的检测可以快速、准确地反映 HCMV 在血液病患者中的早期感染状况。因此，对血液病患者进行 HCMV 感染诊断时，在抗 HCMV 抗体（包括 HCMV-IgM 和 HCMV-IgG）检测的同时，对反映 HCMV 复制指标的 HCMV-DNA 和/或 HCMV 感染的标志 pp65 抗原进行检测是非常必要的，在对早期预防和减少 HCMV 感染引起的并发症方面起到重要作用。

参考文献：

[1] Zhang X,Huang YP,Gao HN,et al. Quantification of cy-

- tomegalovirus glycoprotein Bn DNA in hematopoietic stem cell transplant recipients by real-time PCR [J]. PLoS One, 2012, 7(12): e51224.
- [2] Li L, Ren JH, Cheng ZY, et al. The expression of VEGF and COX-2 in hematologic malignancies and its significance[J]. Journal of Chinese Oncology, 2012, 18(1):51-54. [李琳, 任金海, 成志勇, 等. VEGF 和 COX-2 在恶性血液病中的表达及意义[J]. 肿瘤学杂志, 2012, 18(1):51-54.]
- [3] Rha B, Redden D, Benfield M, et al. Correlation and clinical utility of pp65 antigenemia and quantitative polymerase chain reaction assays for detection of cytomegalovirus in pediatric renal transplant patients [J]. Pediatr Transplant, 2012, 16(6):627-637.
- [4] Chen H, Liu KY, Xu LP, et al. Application of real time polymerase chain reaction to the diagnosis and treatment of cytomegalovirus infection after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation[J]. Chinese Journal of Hematology, 2009, 30(2):77-81. [陈欢, 刘开彦, 许兰平, 等. 异基因造血干细胞移植后实时定量聚合酶链反应在巨细胞病毒感染诊断和治疗中的应用[J]. 中华血液学杂志, 2009, 30(2):77-81.]
- [5] Cariani E, Pollara CP, Valloneini B, et al. Relationship between pp65 antigenemia levels and real-time quantitative DNA PCR for Human Cytomegalovirus (HCMV) management in immunocompromised patients [J]. BMC Infect Dis, 2007, 7:138.
- [6] Li M, Ji YH, Peng YB, et al. Monitor human cytomegalovirus active infection by two quantitatively detect methods[J]. Chinese Journal of Laboratory Medicine, 2002, 25(4):220-222. [李敏, 季育华, 彭奕冰, 等. 早期监测人巨细胞病毒激活感染的两种检测方法的比较[J]. 中华检验医学杂志, 2002, 25(4):220-222.]
- [7] Capria S, Gentile G, Capobianchi A, et al. Prospective cytomegalovirus monitoring during first-line chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia[J]. J Med Virol, 2010, 82(7):1201-1207.
- [8] Fang F, Dong YS. Diagnosis of cytomegalovirus infection [J]. Chinese Journal of Pediatrics, 1999, 37(7):7-8. [方峰, 董永绥. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(7):7-8.]
- [9] Gu GH, Feng B. Determinations of HCMV antibody of patients with leukemia and analysis of its clinical significance[J]. Acta Academiae Medicinae Suzhou, 2001, 21(3): 278-280. [顾国浩, 丰斌. 白血病患者巨细胞病毒抗体检测及其临床意义初探[J]. 苏州医学院学报, 2001, 21(3):278-280.]
- [10] Pan XD, Bai YH, Zhang Y, et al. Method of screening cytomegalovirus reactivation infection in renal transplant recipients and its application[J]. Journal of Medical Research, 2012, 41(9):55-57. [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.]
- [11] Xia JR, Wang FL, Zhu JH. Analysis of active human cytomegalovirus infection with specific antibody[J]. Journal of Chongqing Medical University, 2003, 28(2):195-197. [夏吉荣, 王富兰, 祝继华. 人巨细胞病毒活动性感染的分析[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(2):195-197.]
- [12] Xie DD, Lin Z, Shi HQ, et al. Comparison of pp65 antigenemia assay and polymerase chain reaction for UL83 DNA for detection of HCMV in renal transplant patients [J]. Acta Universitatis Medicinalis Anhui, 2011, 46 (9): 950-952. [谢栋栋, 林政, 施浩强, 等. HCMV pp65 抗原血症和 UL83 基因检测对肾移植术后 HCMV 感染的诊断价值[J]. 安徽医科大学学报, 2011, 46(9):950-952.]
- [13] Solano C, Muñoz I, Gutiérrez A, et al. Qualitative plasma PCR assay (AMPLICOR CMV test) versus pp65 antigenemia assay for monitoring cytomegalovirus viremia and guiding preemptive ganciclovir therapy in allogeneic stem cell transplantation[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11): 3938-3941.
- [14] Qiu J, Chen LZ, Ma Y, et al. Monitoring of plasma CMV viral DNA load by real-time quantitative PCR in renal transplant recipients and implication[J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2008, 25(5):638-640. [邱江, 陈立中, 马毅, 等. 实时定量 PCR 方法监测肾移植患者血浆巨细胞病毒 DNA 载量及其意义[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(5):638-640.]