

·临床研究·

半套式荧光定量聚合酶链反应检测肾移植前后 人巨细胞病毒感染状态^①

郑克立¹ 刘东¹ 谭耀驹²

(1 中山医科大学附属第一医院泌尿外科; 广州, 510080 2 广州市胸科医院)

摘要 目的: 研究肾移植受者手术前后人巨细胞病毒(HCMV)的感染率及 HCMV-DNA 含量变化。方法: 采用半套式荧光定量聚合酶链反应(AmpliSensor-PCR)方法定量检测术前肾移植受者 61 例, 术后 32 例, 用四格表比较手术前、后的感染率, 用 t 检验比较病毒含量。结果: 手术前、后肾移植受者 HCMV 的感染率分别为 77% 和 87.5%; HCMV-DNA 平均含量(拷贝数每升)分别是 $1.07 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 和 $7.41 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 两者之间感染率无显著差异 ($\chi^2 = 1.65, P > 0.05$), 但病毒平均含量存在极显著差异 ($t = 6.46, P < 0.01$)。结论: 研究结果显示: ①免疫抑制治疗激活了潜伏性 HCMV 感染, 导致术后 HCMV 含量显著增加; ②决定肾移植受者 HCMV 感染状态的主要是机体本身的免疫力, 减少 HCMV 感染, 术后合理使用免疫抑制剂, 避免过度抑制可能更重要。

关键词 巨细胞病毒; 感染/诊断; 肾移植/副作用; 定量聚合酶链反应/方法

中图分类号 R 699.2

Detecting Status of Human Cytomegalovirus Infection by Quantitative AmpliSensor-PCR in Preoperative and Postoperative Renal Allograft Recipients

Zheng Keli¹ Liu Dong¹ Tan Yaoju²

(1 Department of Urological Surgery, First Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University of Medical Sciences, Guangzhou, 510080 2 Thoracic Hospital, Guangzhou)

Abstract Objective: To determine the incidence of human cytomegalovirus (HCMV) infection and the quantity of the virus in the peripheral blood in preoperative and postoperative renal allograft recipients. **Method:** 61 preoperative and 32 postoperative renal allograft recipients were detected by quantitative AmpliSensor-PCR. The incidence of HCMV infection and the quantity of HCMV in peripheral blood were subsequently analysed by χ^2 test and t -test, respectively. **Results:** The incidence of HCMV infection in preoperative and postoperative renal allograft recipients were 77% and 87.5%, respectively. Their quantities of HCMV in peripheral blood were $1.07 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ and $7.41 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, respectively. The difference in incidence of HCMV infection was not significant ($\chi^2 = 1.65, P > 0.05$), and the difference in HCMV quantity was highly significant ($t = 6.46, P < 0.01$). **Conclusions:** Results indicate that ① immunosuppressive therapy reactivates latent HCMV infection; ② status of HCMV infection is chiefly determined by recipient's own immunity. In order to decrease the incidence of HCMV infection, it is more important to make use of immunosuppressant reasonably and avoid overimmunosuppression.

Subject headings cytomegalovirus; infection/diagnosis; kidney transplantation/adverse effects; polymerase chain reaction/methods

人巨细胞病毒(HCMV)是一个重要的条件致病因子,在免疫功能正常的健康人极少出现临床症状,而在免疫功能低下或缺陷的患者可能会发展成有严重临床症状的HCMV病,威胁患者的生命。据国外文献报道^[1,2],在肾移植受者中,由于免疫抑制剂的应用,HCMV感染较为常见,术后感染率约为70%左右,其中10%~30%可发展成HCMV病,导致移植肾功能丧失或患者死亡。在我国对肾移植术后病人HCMV感染的严重性已经引起了关注。本文应用半套式荧光定量聚合酶链反应(AmpliSensor-PCR)方法定量检测肾移植病人手术前、后HCMV感染率及外周血HCMV含量变化,藉此,对免疫抑制状态下肾移植病人严重的HCMV感染问题进行了初步探讨。

1 材料与方 法

1.1 检测对象

1997年6月~1998年2月在本院接受肾移植的术前受者61例,其中男40例,女21例,年龄17~73岁,平均38.6岁;术后受者32例,其中男21例,女11例,年龄17~68岁,平均34.4岁。所有受者术后均用环孢素A+强的松+硫唑嘌呤(CsA+Pred+Aza)三联免疫抑制方案。

1.2 标本获得

术前61例受者在手术开始前抽血2 mL,术后32例受者至少使用三联免疫抑制治疗2周后抽血2 mL,标本均用EDTA抗凝。

1.3 主要设备及试剂

AG-9600-DNA体外扩增仪;DNA荧光光度仪;586个人电子计算机及ASAP数据处理软件;HCMV-DNA抽提试剂盒(购自德国QIAGEN公司,批号为120094);AmpliSensor-PCR试剂盒及Taq DNA聚合酶(购自美国Biotronics公司,批号为1040-7081)。

1.4 AmpliSensor-PCR定量检测HCMV-DNA

该方法分:①HCMV-DNA抽提,②标准品构建,③不对称扩增反应,④荧光信号扩增及数据获取4个步骤^[3]。

1.5 HCMV-Ag的检测

应用链菌素生物素标记法(LSAB法)同时检测术后32例受者的HCMV-Ag。该试剂盒购自丹麦DAKO公司。

1.6 统计分析

HCMV-DNA的平均含量应用几何均数计算,显著性比较用 t 检验,感染率的比较用四格表,显著水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结 果

2.1 手术前、后HCMV感染状况

应用AmpliSensor-PCR方法检测术前病人61例,阳性率为77%,检测术后病人32例,阳性率为87.5%,二者之间无显著性差异。结果见表1。

表1 肾移植受者手术前后HCMV感染例数 (n/1)

Table 1 Comparison of the incidence of HCMV infection in preoperative and postoperative renal allograft recipients

	Positive Cases	Negative Cases	Total
Preoperative	47	14	61
Postoperative	28	4	32
Total	75	18	93

$$\chi^2 = 1.65, P > 0.05$$

2.2 手术前、后末梢全血中HCMV含量比较

术前47例和术后28例HCMV阳性患者末梢全血中病毒含量(HCMV-DNA拷贝数每升)采用几何均数进行比较,计算得知最后实际病毒含量分别为 $1.07 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 和 $7.41 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$,两者之间存在显著性差异。

2.3 AmpliSensor-PCR与HCMV-Ag方法检测结果比较

术后32例受者同时应用上述两种方法进行检测,HCMV-Ag检测结果阳性者AmpliSensor-PCR结果均阳性,而AmpliSensor-PCR检测结果阳性者HCMV-Ag结果不一定阳性(表2)。

表2 AmpliSensor-PCR与HCMV-Ag检测结果比较

Table 2 Comparison of the two kinds of detective method, HCMV-DNA-PCR and HCMV-Ag

	Positive	Negative	Total
HCMV-DNA-PCR	28	4	32
HCMV-Ag	19	13	32
Total	47	17	64

$$\chi^2 = 6.5, P < 0.05$$

3 讨论

3.1 AmpliSensor-PCR 特点

目前临床上常用的 HCMV 检测方法主要有 HCMV 白细胞抗原血症 (HCMV-Ag) 试验和聚合酶链反应 (PCR)。HCMV 白细胞抗原血症 (HCMV-Ag) 试验简单、快速, 国内外均有应用于临床检测的报道。但 HCMV-Ag 检测是利用针对 HCMV 即刻蛋白的单克隆抗体, 应用免疫组化染色的方法对感染细胞核进行染色, 可以直接反映外周血中有无活动性 HCMV 感染。而隐性感染者 HCMV 潜伏无复制, 故无病毒蛋白表达, 抗原染色为阴性。该方法的另一缺点是敏感性受实验条件影响大; 延迟检测标本时, 会降低检出阳性率, 且只适合血液标本。聚合酶链反应 (PCR) 以其快速、敏感、特异检测目的基因, 在 HCMV 感染实验室诊断中发挥着重要的作用, 以前的文献报道主要是定性诊断^[4, 9]。其最大缺点是有时会产生高本底和假阳性。国外文献报道^[6], 术前受者外周血白细胞中病毒颗粒的数目低于 $5/10^5$, 常规 PCR 不能检测出 HCMV-DNA。AmpliSensor-PCR^[7] 是近几年发展起来一种较好的定量 PCR 方法。它属于封闭式半套式 PCR 扩增系统, 比常规 PCR 敏感性高, 同时免除了传统的电泳, 减少了样品污染的机会; 其另一优点是在扩增过程中进行实时在线检测, 并选择理想的标准曲线作出较精确的定量分析。本文对术后 32 例病人同时应用 AmpliSensor-PCR 和 HCMV-Ag 方法检测, 结果显示 HCMV-Ag 检测阳性者, AmpliSensor-PCR 结果均为阳性; AmpliSensor-PCR 阴性者, HCMV-Ag 均为阴性, 而 9 例 HCMV-Ag 阴性者, AmpliSensor-PCR 结果均为阳性。上述结果说明 AmpliSensor-PCR 敏感性比 HCMV-Ag 高, 能检测出潜伏无复制的隐性 HCMV 感染。从未梢血中检测出 HCMV 是诊断 HCMV 感染最可靠的证据, 但不一定意味着活动性 HCMV 感染, 而采用定量 AmpliSensor-PCR 检测技术能够从 HCMV-DNA 水平的高低来鉴别感染的类型, 对于指导抗病毒治疗以及监测疗效有一定临床价值。我们在临床中观察到两例抗 HCMV 治疗的病人, 治疗开始时其病毒含量分别是 $1.08 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$ 和 $1.30 \times 10^8 \text{ L}^{-1}$, 治疗 1 周后减少到 $4.09 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 和 $3.12 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 再继续治疗 1 周检测结果变为阴性。

3.2 肾移植受者手术前、后 HCMV 感染率

国内文献报道^[8], 健康献血者 HCMV-DNA 检出率为 77.3% ~ 80.4%; 国外报道^[9], 肾移植术后 HCMV 感染率为 42% ~ 93%。本文检测结果: 手术前、后 HCMV 感染率分别为 77% 和 87.5%。统计分析两者之间仅有量的不同, 没有显著性差异。产生此结果的可能原因为: ①肾移植病人作为一组特殊的免疫抑制群体, 术后采取了严格的消毒隔离措施, 尽量避免输注血液和/或血液制品, 切断 HCMV 可能传播途径, 加之合理使用免疫抑制剂, 故手术后 HCMV 感染率较术前没有明显增加; ②虽然两者之间没有显著性差异, 但在手术后的 HCMV 含量却明显高于术前。这给了我们两点启示: 一是在有效控制 HCMV 外源性传播的情况下, 免疫抑制剂仅激活患者体内潜伏感染的 HCMV, 引起内源性 HCMV 复制, 而对术后 HCMV 感染率没有显著影响; 二是供者 HCMV 感染状况对术后受者 HCMV 感染率无显著影响, 由此推测肾脏可能不是 HCMV 终宿主组织。

3.3 肾移植受者手术前、后 HCMV 含量变化

目前国内外还未见对肾移植受者手术前、后 HCMV 含量进行定量检测的报道。本文结果显示: 手术前、后 HCMV 感染率虽然没有统计学差异, 但两者的 HCMV 平均水平分别为 $1.07 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ 和 $7.41 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$, 在统计学上存在极显著的差异性。此结果说明虽然术后对肾移植病人采取了有效地预防措施, 切断 HCMV 可能传播途径, 但免疫抑制剂的使用又激活了潜伏感染的 HCMV, 使其大量而迅速的复制。故手术后 HCMV 感染率虽没有明显增加, 而 HCMV 含量却明显增加了。Staa^[10] 报道, OKT₃ 能够促进肿瘤坏死因子 (TNF) 的释放, 而 TNF 又可促进 HCMV 调控基因表达调控蛋白-即刻早期蛋白, 引发 HCMV 活化复制, 进而使潜伏性 HCMV 感染转化为活动性 HCMV 感染。在临床工作中观察到对难于控制的急性排斥, 必需使用 OKT₃ 或 ALG/ATG 时, 活动性 HCMV 感染的发病率会明显增加。一般应用 OKT₃ 4 d 后, HCMV 病的发生率增加 50%。AmpliSensor-PCR 对 HCMV 含量进行定量检测, 同时配合 HCMV 白细胞抗原血症试验, 为免疫抑制治疗, 特别是使用 OKT₃ 或长期使用 ALG/ATG 后, 应用丙氧鸟苷预防、治疗活动性 HCMV 感染或 HCMV 病提供了客观依据。动态监测 HCMV-DNA 含量变化能够较准确评价治疗效果、选择药

物、调整剂量和决定疗程, 避免盲目预防性用药, 增加药物的副作用和病人的经济负担。

总之, 预防 HCMV 的传播, 只是防治 HCMV 感染的一个方面。而传播 HCMV 也并非简单的病毒植入, 起决定作用的是宿主本身的免疫机能状态。盲目提高肾移植病人的免疫力, 则可能导致急性排斥的发生。因此对肾移植病人 HCMV 感染的预防仅限于避免血液或血液制品的输注及对供体的筛选是不够的, 术后合理使用免疫抑制剂, 避免病人免疫力过度抑制可能更为重要。

参 考 文 献

- 1 Ho M. CMV infection and indirect sequelae in the immunocompromised transplant patients. *Transplant Prog* 1991, 23 (s1): 2
- 2 Metselaar H J, Weimar W. Cytomegalovirus infection and renal transplantation. *J Antimicrob Chemther*, 1989, 23: 37
- 3 谭耀驹, 李一耕, 谭守勇, 等. AmpliSensor 聚合酶链反应技术检测结核分枝杆菌及临床应用. *中华结核和呼吸杂志*, 1998, 21(2): 79
- 4 Van Dorp W T, Vlieger A, Jiwa N W, *et al*. The polymerase chain reaction, a sensitive and rapid technique for detection cytomegalovirus infection after transplantation. *Transplantation*, 1992, 54(3): 661
- 5 Einsele H, Ehninger G, Steidle M, *et al*. Polymerase chain reaction to evaluate antiviral therapy for cytomegalovirus disease. *Lancet*, 1991, 338(9): 1170
- 6 Rowley A H, Wolinsky S W, Sambol S P, *et al*. Rapid detection of cytomegalovirus DNA or RNA in blood of renal transplant patients by *in vitro* enzymatic amplification. *Transplantation*, 1991, 51(5): 1028
- 7 Wang C N, Wu K Y, Wang H T. Quantitative PCR using the AmpliSensor assay. In: Dieffennach C W, Dveksler G S, eds. *A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995. 193~202
- 8 孟潞英, 周宗海, 张文炳, 等. 用 PCR 法检测稀献血员单核细胞中的 CMV-DNA. *中国病毒学*, 1993, 8(1): 16
- 9 Willem J, Son V, Eric J, *et al*. Pneumocystis carinii pneumonia in patients after cadaveric kidney transplantation; possible relationship with an active cytomegalovirus infection. *Transplantation*, 1984, 38(5): 506
- 10 Staak K, Prosch S, Stein J, *et al*. Pentoxifylline promotes replication of human cytomegalovirus *in vivo* and *in vitro*. *Blood*, 1997, 89(10): 3682

(1998 - 07 - 02 收稿 1998 - 12 - 13 修回)

·新成果·

鼻咽癌高危人群、癌前病变的确立

课题负责人 黄腾波

(中山医科大学肿瘤防治中心; 广州, 510060)

本研究是国家“七五”“八五”科技攻关项目, 在已知 EB 病毒与鼻咽癌密切相关基础上, 通过流行病学、病理、分子生物学等先进技术和方法, 对广东省鼻咽癌高发区四会、中山、广州近 10 万人长达 10 年筛查的前瞻性研究, 提出了适用于高发区的鼻咽癌高危人群优化筛查方案及判断标准, 并对癌变风险进行评估, 在国内首次提出鼻咽癌不同高发区人群患癌风险差异及“鼻咽粘膜上皮增生是鼻咽癌癌前病变”的概念, 并对鼻咽癌中病毒基因(DNA 片段, EBERS)的表达进行研究, 探讨 EBV 在癌变过程中的作用。该研究提高了鼻咽癌早诊率、生存率、降低了死亡率, 为鼻咽癌 II 级预防提供了充分科学依据。于 1998 年获卫生部医药卫生科学技术进步三等奖。

(陈丽芳)