

# 实时荧光定量 PCR 方法监测造血干细胞移植患者人巨细胞病毒感染的临床意义

肖小红, 陈伟

作者单位: 417000 湖南, 娄底市中心医院输血科

作者简介: 肖小红(1976-), 女, 大学本科, 医学学士, 主管检验师, 研究方向: 临床分子生物学。E-mail: 77141275@qq.com

通讯作者: 陈伟(1983-), 男, 医学硕士, 主管检验师, 研究方向: 分子免疫学。E-mail: chenweiwex@sina.com

**[摘要]** 目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法监测造血干细胞移植(HSCT)患者人巨细胞病毒(HCMV)感染的临床意义。方法 应用实时荧光定量 PCR 方法动态监测 32 例造血干细胞移植患者血标本 HCMV-DNA 载量, 并与 30 名健康对照者进行对比分析。结果 32 例患者阳性率为 21.9% (7/32), 病死率为 3.13% (1/32)。30 名对照者阳性率为 3.33% (1/30)。7 例阳性患者均经 CMV 抗病毒治疗, 其中 1 例在第 56 天死亡, 1 例在监测到 70 d 持续阳性, 其余 5 例转阴。结论 实时荧光定量 PCR 方法检测 HCMV-DNA 对造血干细胞移植患者人巨细胞病毒感染的早期诊断及动态监测具有重要的临床意义。

**[关键词]** 人巨细胞病毒; 造血干细胞移植; 实时荧光定量 PCR

**[中图分类号]** R 63 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1674-3806(2016)01-0057-03

doi: 10.3969/j.issn.1674-3806.2016.01.19

**Clinical significance of monitoring human cytomegalic inclusion disease virus after haemopoietic stem cell transplantation by real-time PCR** XIAO Xiao-hong, CHEN Wei. Department of Blood Transfusion, the Central Hospital of Loudi, Hunan 417000, China

**[Abstract]** **Objective** To evaluate the value of real-time fluorogenic quantitative PCR assay for early detecting and dynamic monitoring human cytomegalovirus(HCMV) activation after hematopoietic stem cell transplantation (HSCT). **Methods** HCMV-DNAs of 32 bonemarrow transplant recipients and 30 healthy people were dynamically monitored using real-time PCR. **Results** Among the 32 patients, the positive rate was 21.9% (7/32) and the case fatality ratio was 3.33% (1/30). In the control group, the positive rate was 3.13% (1/32). Among all 7 positive patients who were treated with antiviral therapy, One patient died in 56 days and the other 6 patients was negative except that one patient was positive for 70 days. **Conclusion** The quantitative detection for HCMV-DNA by real-time PCR has clinical significance for early diagnosing and dynamically monitoring HCMV in fections in HSCT patients.

**[Key words]** Human cytomegalovirus(HCMV); Hematopoietic stem cell transplantation(HSCT); Real-time PCR

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)在人群中能导致的感染率很高,发达国家约为 60%,在发展中国家,或者某些特殊人群中,感染率超过 95%<sup>[1]</sup>。造血干细胞移植是近年来治疗各类血液系统疾病、自身免疫性疾病及一些恶性肿瘤的一种有效手段。HCMV 感染是造血干细胞移植(hematopoietic stem cell transplantation, HSCT)受者术后最重要的并发症。在 HSCT 术后早期(8~10 个月内),由于机体免疫系统(主要是细胞免疫)尚未完全恢复,体内潜伏感染或经输血获得的 HCMV 复燃,容易发生 HCMV 感染<sup>[2]</sup>。HCMV 可导致间质性肺炎、

CMV 性肠炎等,若没有得到及时确诊并有效治疗,病死率高达 80% 以上。在 HCMV 发生之前及时使用抗病毒药物治疗,可以有效控制病毒感染,降低移植受者的病死率<sup>[3,4]</sup>。因此,对 HCMV 病的早期诊断和动态监测对患者及时进行抗病毒治疗、降低病死率具有重要的临床意义。本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)方法对 32 例 HSCT 术后患者外周血 HCMV-DNA 进行动态定量监测,探讨实时荧光定量 PCR 法对 HCMV 活动性感染的诊断价值及对临床用药的指导意义。

### 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 选择 2013-06 ~ 2014-06 南华大学附属娄底市中心医院血液科收治的 HSCT 患者 32 例,其中男 20 例,女 12 例,平均年龄 42 岁,其中急性髓系白血病 7 例,急性淋巴细胞白血病 8 例,慢性髓系白血病 10 例,骨髓增生异常综合征 7 例。所有患者常规进行移植后巨细胞病毒监测,直至停用全部免疫抑制剂。对照组 30 名来自健康体检人群,各项体检指标均无明显异常。

#### 1.2 实验方法

**1.2.1 仪器和试剂** DNA 抽提试剂盒购自北京天根生物科技公司;HCMV 荧光定量试剂盒购自大连宝生物工程公司;Smart Cycler II qRT-PCR 仪购自美国 Cepheid 公司。

**1.2.2 标本采集** 无菌操作采集患者 EDTA 抗凝静脉血 5 ml,使用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞,加 50  $\mu$ l DNA 提取液充分混匀,沸水浴 10 min, 12 000 r/min,离心 5 min,取上清液直接用于 PCR 或 -20  $^{\circ}$ C 冻存备用。引物序列:根据 Gene Bank 上的 HCMV-UL83 基因序列设计两对引物,上游引物:5'-ccg etc agt cgc cta cac ccg ta-3',下游:5'-ctg gct ggg gca gat get t-3'。扩增条件:93  $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 93  $^{\circ}$ C 变性 45 s,55  $^{\circ}$ C 退火 60 s,10 个循环;93  $^{\circ}$ C 变性 30 s,55  $^{\circ}$ C 退火 45 s,40 个循环。

**1.3 荧光定量检测结果判定** 试剂盒提供的阳性标准品(104 - 107)以及阴性对照同时扩增,得出所测样本中的核酸载量值,用基因拷贝/ml 表示。每次试验中,阴性对照的 Ct 值(循环阈值)不显示任

何数值,检测下限为  $5.0 \times 10^2$  拷贝/ml。以 DNA 定量拷贝数  $< 1 \times 10^3$  copies/ml;或 Ct 值无读数的样本为阴性样本;检测样本 Ct 值  $\leq 35.0$  者判为阳性,Ct 值  $> 35.0$  的样本重新进行测量,Ct 值  $< 37$  者为阳性。

**1.4 统计学方法** 应用 SPSS17.0 统计软件进行数据处理,计数资料比较采用  $\chi^2$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

### 2 结果

**2.1 骨髓移植后 HCMV-DNA 阳性率** 实时荧光定量 PCR 共检测 32 份病例血标本,出现 7 份阳性,阳性率为 21.9%。阳性病例病毒载量介于  $5.0 \times 10^3 \sim 1.0 \times 10^7$  拷贝/ml 之间。1 例阳性结果病例在监测到 56 d 时死亡,病死率为 3.13% (1/32)。30 名对照者阳性率为 3.33% (1/30),HCMV 载量介于  $5.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^4$  拷贝/ml 之间。移植组与对照组间阳性率比较差异具有统计学意义( $P < 0.01$ )。见图 1,表 1。

**2.2 HCMV 感染的动态监测及转归** 7 例阳性患者均经 CMV 抗病毒治疗(更昔洛韦和膦甲酸钠),其中 1 例在第 56 天死亡,1 例监测到 70 d 持续阳性,其余 5 例转阴。见表 1。

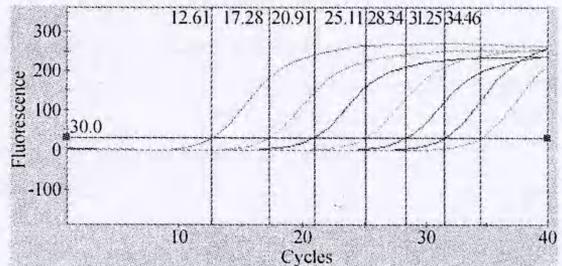


图 1 HCMV-UL83 基因扩增曲线图

表 1 7 例 HSCT 术后 HCMV 感染者 HCMV-DNA 含量动态变化情况(拷贝/ml)

| 病例编号 | 7 d                | 14 d               | 28 d               | 42 d               | 56 d               | 70 d               |
|------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| 1    | 0                  | $7.42 \times 10^4$ | $5.32 \times 10^6$ | $2.92 \times 10^6$ | 死亡                 |                    |
| 2    | $4.56 \times 10^4$ | $6.52 \times 10^3$ | 0                  | 0                  | 0                  | 0                  |
| 3    | 0                  | 0                  | 0                  | $6.42 \times 10^4$ | $5.72 \times 10^3$ | 0                  |
| 4    | 0                  | 0                  | $8.62 \times 10^4$ | $5.92 \times 10^5$ | $1.25 \times 10^5$ | $6.45 \times 10^4$ |
| 5    | $5.92 \times 10^3$ | $1.48 \times 10^5$ | $2.45 \times 10^5$ | $4.05 \times 10^3$ | 0                  | 0                  |
| 6    | $2.45 \times 10^5$ | $4.95 \times 10^3$ | 0                  | $4.44 \times 10^3$ | $3.80 \times 10^4$ | 0                  |
| 7    | 0                  | $2.45 \times 10^5$ | $6.45 \times 10^5$ | $2.58 \times 10^4$ | 0                  | 0                  |

### 3 讨论

**3.1 HSCT 作为治疗血液系统疾病和某些恶性肿瘤的有效措施,已广泛用于临床。而 HCMV 感染是 HSCT 患者的常见并发症,也是导致患者死亡的主要原因。临床症状主要表现为发热并伴有白细胞减少、间质性肺炎、胃肠炎、肝炎、视网膜炎、脑炎及多**

**发性神经根炎等<sup>[5]</sup>。**

**3.2 HCMV 属于疱疹病毒科,是一种特异性的 DNA 病毒,为已知人类疱疹病毒中最大的一组病毒<sup>[6]</sup>。HCMV 在普通人群中的感染率很高,大多数感染呈临床不显性感染或潜伏感染<sup>[7]</sup>。HSCT 术后应用免疫抑制剂使机体抵抗力下降,潜伏病毒重新**

激活,引起 HCMV 活动性感染,包括 HCMV 间质性肺炎、肝炎、胃肠炎等。所以建立敏感性和特异性都比较高的 HCMV 检测方法,及时应用抗病毒治疗,对于预防和减少 HCMV 病的发生、降低移植受者的病死率具有重要意义<sup>[8]</sup>。目前临床上有许多检测 HCMV 的方法,如 ELISA 测定抗体、病毒分离法、流式细胞术、抗原血症法和各种 PCR 测定 HCMV-DNA 等。HSCT 患者中病毒分离法的阳性率明显低于抗原血症法和 PCR 法。抗原血症法的敏感性和特异性比较高,并且抗原血症水平与 HCMV 疾病的严重程度相关,但该方法检测时间长、标本需要及时处理、且标本中的白细胞数目须达到一定的数量等缺点,限制了其在临床的应用<sup>[9]</sup>。实时荧光定量 PCR 方法简便、快速,并且能监测移植受者移植后病毒载量的动态变化来判断抗病毒药物是否有效,对判断 HCMV 活动性感染及预测 HCMV 疾病的发生更有临床指导意义。本研究中发现有个别病例在使用抗病毒药物后,HCMV 载量下降直至转阴,随着药物减量或停止使用,HCMV 的病毒载量马上出现反弹<sup>[10]</sup>,所以运用实时荧光定量 PCR 方法对 HSCT 患者持续地进行 HCMV 监测能为抗病毒治疗过程中观察药物疗效,分析是否出现耐药和预测 HCMV 疾病复发提供重要依据。对于提高 HSCT 患者的长期生存率,具有重要的临床意义。

#### 参考文献

1 Griffiths PD, Emery VC, Milne RC. Cytomegalovirus [A]. In: Douglas D, Richmand, Whitley RJ, editors. Clinical virology [M]. ASM Press, 2009: 475 - 506.

- 2 Chemaly RF, Ullmann AJ, Ehninger G. CMV prophylaxis in hematopoietic-cell transplantation [J]. N Engl J Med, 2014, 371 (6): 576 - 577.
- 3 Kharfan-Dabaja MA, Boeckh M, Wilck MB, et al. A novel therapeutic cytomegalovirus DNA vaccine in allogeneic haemopoietic stem-cell transplantation: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. Lancet Infect Dis, 2012, 12 (4): 290 - 299.
- 4 赵晓甦, 刘代红, 许兰平, 等. 异基因造血干细胞移植后巨细胞病毒肺炎临床特点分析 [J]. 北京大学学报 (医学版), 2009, 41 (5): 548 - 553.
- 5 Bontant T, Sedlacek P, Balduzzi A, et al. Survey of CMV management in pediatric allogeneic HSCT programs, on behalf of the inborn errors, infectious diseases and pediatric diseases working parties of EBMT [J]. Bone Marrow Transplant, 2014, 49 (2): 276 - 279.
- 6 Muñoz-Cobo B, Solano C, Costa E, et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies [J]. Biol Blood Marrow Transplant, 2011, 17 (11): 1602 - 1611.
- 7 万华, 都莉. 免疫低下状态群体感染人巨细胞病毒的研究进展 [J]. 实验与检验医学, 2012, 30 (6): 573 - 575.
- 8 Ruiz-Camps I, Len O, de la Cámara R, et al. Valganciclovir as preemptive therapy for cytomegalovirus infection in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients [J]. Antivir Ther, 2011, 16 (7): 951 - 957.
- 9 Mannonen L, Loginov R, Helantera I, et al. Comparison of two quantitative real-time CMV-PCR tests calibrated against the 1st WHO international standard for viral load monitoring of renal transplant patients [J]. J Med Virol, 2014, 86 (4): 576 - 584.
- 10 陈博, 杨威. 白血病患者造血干细胞移植后巨细胞病毒感染临床病例荟萃分析 [J]. 中国感染与化疗杂志, 2011, 11 (3): 237 - 240.

[收稿日期 2015-05-25][本文编辑 韦颖]

## 《国外英文生物医学期刊中文译名对照手册》

### 邮购启事

随着医学科学和信息技术的快速发展,医学学术论文写作和医学期刊编辑出版的标准化、规范化的要求越来越严格。目前我国生物学药学期刊已达 1 400 多种,每年所刊发的学术论文数十万篇,但我们在长期的期刊编辑工作中发现,在众多的医学论文中发生引用、参考、著录、编译外文医学期刊期名不全、不规范、不标准、错漏及缩写语不正确等问题较为普遍,严重影响了论文和期刊的学术质量。因此,为了更方便、有效、快捷地使广大的医药卫生科技人员和广大的读者、论文作者、期刊编者全面、正确地掌握和标准、规范使用和参考及著录国外英文期刊及缩写语,我们收集了国外 3 000 多种英文生物医学、药学期刊,对其规范的英文全名、缩写语和中文名称进行了编译,并注明出版地,按英文字母顺序进行编排,便于读者、论文作者和期刊编者查阅和对照。本书能有效地帮助广大的医学科研、教学、临床业务人员,在校的博士生、硕士生、本科生,医学期刊编辑人员和图书情报信息人员解决在撰写、修改和编辑科研报告、学位论文,学术论文中查阅、参考外文医学期刊不方便,引用、著录不规范、不标准的问题,以提高广大医学业务技术人员学术论文写作的水平和期刊的编辑学术质量。

本书大 32 开本,彩色封面,精美印刷,已由接力出版社出版,每册售价 20 元,由《中国临床新医学》杂志编辑部发行。订阅者请通过邮局直接汇款(书价 20 元,挂号邮费 5 元,共计 25 元)到编辑部订购(请在汇单上注明“购手册”)。款到即发货并开具正式发票。

汇款邮编、单位及地址:530021 广西南宁市桃源路 6 号《中国临床新医学》杂志编辑部

收款人:韦颖