

DOI:10.7499/j.issn.1008-8830.2013.12.011

新生儿疾病专题

咽拭子在新生儿先天性人巨细胞病毒感染筛查中的应用

汪晓婷 董质冰 罗丽明 邓敏

(武汉科技大学附属普仁医院儿科, 湖北 武汉 430081)

[摘要] 目的 探讨咽拭子 PCR 检测在新生儿先天性人巨细胞病毒 (HCMV) 活动性感染筛查中的临床应用价值。方法 收集 51 例新生儿的咽拭子和脐血标本, 均进行 HCMV gB 的巢式 PCR 检测, 其中 18 例进行脐血 pp65 抗原检测。结果 巢式 PCR 法检测咽拭子 HCMV gB 基因的灵敏度和特异性分别为 67% 和 75%, 其阳性预测值和阴性预测值分别为 57% 和 82%。结论 咽拭子 HCMV gB 的巢式 PCR 检测, 具有无创、快速、特异的优点, 有望成为新生儿 HCMV 先天性活动性感染筛查的最佳检测手段。

[中国当代儿科杂志, 2013, 15(12): 1086-1088]

[关键词] 人巨细胞病毒; 咽拭子; 脐带血; 先天性感染; 新生儿

Application of throat swab nested PCR in the diagnosis of congenital human cytomegalovirus infection in neonates

WANG Xiao-Ting, DONG Zhi-Bing, LUO Li-Ming, Deng Min. Department of Pediatrics, Puren Hospital Affiliated to Wuhan University of Science and Technology, Wuhan 430081, China (E-mail: xiaotingwang0604@sina.com)

Abstract: Objective To evaluate the clinical application value of throat swab nested PCR for detecting active congenital human cytomegalovirus (HCMV) infection in neonates. **Methods** The throat swabs and umbilical cord blood specimens from 51 neonates were collected for nested PCR assay for HCMV glycoprotein B (gB) gene. Moreover, 18 of them were subjected to a pp65 antigen test. **Results** The sensitivity and specificity of throat swab nested PCR for HCMV gB gene were 67% and 75%, respectively, and the positive and negative predictive values were 57% and 82%, respectively. **Conclusions** Throat swab nested PCR assay for HCMV gB gene is non-invasive, rapid, and highly sensitive for HCMV detection and holds promise as an excellent screening technology for detecting active congenital HCMV infection in neonates.

[Chin J Contemp Pediatr, 2013, 15(12): 1086-1088]

Key words: Human cytomegalovirus; Throat swab; Umbilical cord blood; Congenital infection; Neonate

人巨细胞病毒 (human cytomegalovirus, HCMV) 属疱疹病毒家族的线性双链 DNA 病毒, 是常见的 β -疱疹病毒。HCMV 先天性感染是指在生后 14 d 内确诊 HCMV 感染, 是造成新生儿畸形的重要病因之一^[1-2]。为探讨巢式 PCR 用于检测咽拭子 HCMV gB 在新生儿先天性 HCMV 感染筛查中的临床应用价值, 本研究以 pp65 抗原检测阳性为先天性 HCMV 活动性感染的诊断金标准, 收集 51 份健康产妇所生新生儿脐带血和咽拭子标本, 对 HCMV gB 的巢式 PCR 检测与脐血 pp65 抗原检测结果进行对比分析, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2011 年 3~7 月期间在本院分娩的新生儿 51 例为研究对象, 均为健康产妇娩出的新生儿。脐血在胎儿娩出后未断脐时于脐带胎儿端抽取, 同时采集新生儿咽拭子标本, 标本采集后 6 h 内处理。

1.2 方法

1.2.1 脐血总 DNA 的提取 抽取新生儿脐带血 5 mL, 收集至无菌抗凝试管中, 4℃ 保存备用。使

[收稿日期] 2013-03-19; [修回日期] 2013-05-07

[作者简介] 汪晓婷, 女, 硕士, 医师。

用全血 DNA 抽提试剂盒 (Solarbio 公司), 按试剂盒说明书的操作提取 DNA, -20°C 保存备用。

1.2.2 脐血白细胞分离纯化及涂片 取 2 支无菌离心管, 每管加入 2 mL 淋巴细胞分离液备用, 另取 2 mL 无菌抗凝脐血, 加等量 PBS 液, 混匀后分装入已加淋巴细胞分离液的离心管, 2 mL/支, 1500 r/min, 离心 20 min; 吸取灰白层 (白细胞) 至新离心管, 加 12 mL PBS 液, 1500 r/min, 离心 20 min; 弃上清, 加 PBS 液重悬, 调制细胞浓度为 2.0×10^5 , 涂片备用。

1.2.3 咽拭子总 DNA 的提取 无菌棉拭子轻刮新生儿咽喉部, 置于运送培养液 (含 3% FBS 的 DMEM) 中, -20°C 保存备用。使用 Promega 公司 DNA IQTM System-Small Sample Casework Protocol 试剂盒提取咽拭子标本 DNA, 按说明书操作, -20°C 保存备用。

1.2.4 巢式 PCR 检测 HCMV gB 引物设计: 引物选自 HCMVgB 基因保守序列, 通过 Primer 5.0 生物软件自行设计, 并经 BLAST 比对, 由上海 Invitrogen 公司合成。外侧上游引物为 5'-GGAAACGTGTCCGTCTTTGA-3', 下游引物为 5'-GAGTAGCAGCGTCCTGGCGA-3'; 内侧上游引物为 5'-GGAACTGGAACGTTTGGC-3', 下游引物为 5'-GAAACGCGCGCAATCGG-3'。

首轮反应体系及条件: 25 μL 的 PCR 反应体系中包括: 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , MgCl_2 0.75 μL , 10 mM dNTP 0.5 μL , 外侧上下游引物 (20 μM) 各 0.5 μL , Invitrogen Taq 酶 0.25 μL , DNA 模板 2 μL , 无菌去离子水补足体积至 25 μL 。反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 54°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72°C 终延伸 10 min。

第二轮反应体系及条件: 25 μL 的 PCR 反应体系中包括: 10 $\times$ Buffer 2.5 μL , MgCl_2 0.75 μL , 10 mM dNTP 0.5 μL , 内侧上下游引物 (20 μM) 各 0.5 μL , Invitrogen Taq 酶 0.25 μL , 首轮反应产物 2 μL , 无菌去离子水补足体积至 25 μL 。反应条件为: 95°C 预变性 3 min; 95°C 变性 30 s, 60°C 退火 40 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72°C 终延伸 10 min。

最后进行琼脂糖凝胶电泳鉴定: 扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳 (5 V/cm, 20 min), 溴化乙锭 (EB) 染色 (0.20 $\mu\text{g}/\text{mL}$); 紫外透射仪下观察结果, 可见一荧光带大小为 285 bp, 所有阳性结果均测序并经 BLAST 比对证实为 HCMV gB。

1.2.5 pp65 抗原检测 异硫氰基荧光素 (FITC) 标记的 HCMV pp65 单克隆抗体购自美国 Millipore 公司。步骤: PBS 液冲洗涂片 2 次; 1% Triton100 滴加于涂片上, 37°C 破膜 10 min; PBS 液洗涤后 37°C 避光封闭 1 h; 滴加 FITC 标记的 pp65 (1:150 稀释) 单克隆抗体, 37°C 孵育 2 h; PBS 液洗涤后, DAPI 37°C 避光染色 10 min; 0.1% 伊文思蓝 37°C 避光复染 10 min; 80% 甘油封片; 使用荧光显微镜观察结果, 蓝色为 DAPI 染色的胞核, 红色为伊文思蓝着色的包膜结构, 绿色或黄绿色荧光为 FITC 标记的 pp65 蛋白阳性信号, HCMV pp65 抗原阳性细胞数 ≥ 5 个/ 2×10^5 单个核细胞为抗原阳性。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 16.0 统计软件对数据进行分析, 使用 χ^2 检验四格表修正公式对两种检测方法阳性检出率进行比较分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 巢式 PCR 检测咽拭子与脐血 HCMV gB 结果比较

51 例新生儿脐血标本中, HCMV gB 检测阳性 9 例, 阴性 42 例, 阳性率为 18%; 51 例咽拭子标本中, HCMV gB 检测阳性 16 例, 阴性 35 例, 阳性率为 31%。咽拭子与脐血 HCMV gB 的巢式 PCR 检测结果符合率为 82% (42/51)。经卡方检验咽拭子阳性检出率高于脐血 ($\chi^2=16.792$, $P=0.0001$), 见表 1。

2.2 巢式 PCR 检测咽拭子 HCMV gB 与脐血 pp65 抗原检测结果比较

18 例新生儿的脐血标本进行了 pp65 抗原检测。该 18 例新生儿的咽拭子标本中, HCMV gB 阳性 7 例, 阳性率 39%; 脐血 pp65 抗原阳性 6 例, 阳性率 33%。两种检测方法一致性为 72% (13/18)。经卡方检验两种方法阳性检出率比较差异无统计学意义 ($P=0.087$)。新生儿咽拭子 HCMV gB 的巢式 PCR 检测灵敏度和特异性分别为 67% (4/6) 和 75% (9/12); 其阳性预测值和阴性预测值分别为 57% (4/7) 和 82% (9/11)。见表 2。

表 1 巢式 PCR 检测咽拭子和脐血 HCMV gB 结果比较

咽拭子 HCMV gB	脐血 HCMV gB		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	8	8	16.792	0.0001
阴性	1	34		

表 2 咽拭子的巢式 PCR 检测与 pp65 抗原检测结果比较

咽拭子 HCMV gB	pp65 抗原		χ^2 值	P 值
	阳性	阴性		
阳性	4	3	2.922	0.087
阴性	2	9		

3 讨论

HCMV 基因组为长约 240 kb 的双链 DNA，主要由立即早期基因（ie）、早期基因（e）和晚期基因（l）构成。其中 ul55 属于 l 基因，位于中高度保守的 B 区，编码 HCMV 主要的结构糖蛋白 gB 糖蛋白，是 HCMV 胞膜中最丰富的糖蛋白，占包膜蛋白的 50% 以上，在病毒侵入机体过程中起吸附融合宿主细胞的作用^[3]。pp65 蛋白是由 HCMV ul83 基因编码，HCMV gB 和 pp65 蛋白均可诱导较强的抗体反应，具有很高的免疫原性^[4]。

诊断新生儿先天性 HCMV 感染的检测手段也很多^[5]，其中病毒分离实验是先天性 HCMV 感染的诊断“金标准”，但是由于耗时费力，限制了临床应用，血清学 HCMV 抗体检测由于其特异性不高也已不能完全满足临床诊断先天性感染的要求。Yague 等^[6]的试验结果表明，与病毒分离实验相比较，HCMV pp65 抗原血症检测诊断活动性 HCMV 感染的敏感性和特异性均在 95% 以上，是新近被广泛开展并得以接受的相对“金标准”，但其操作步骤繁琐，目前市场上没有自动化 pp65 抗原血症诊断试剂盒。而 PCR 扩增技术具有简便、快速、敏感性高等优点^[7-8]，更适用于大规模筛查实验。

咽拭子样本采样简便易行，已被广泛用于临床诊断^[9-11]，国内现阶段暂无巢式 PCR 检测咽拭子标本用于诊断 HCMV 先天性感染的报道。被感染的新生儿唾液里有高滴度的 HCMV^[8]，因此咽拭子样本有望成为诊断新生儿先天性 HCMV 感染的最佳样本之一。本研究采集了 51 例健康产妇分娩新生儿的咽拭子和脐血标本，分别提取 DNA 进行 HCMV gB 的巢式 PCR 检测，二者一致率为 82%。其中咽拭子阳性率为 31%，明显高于脐血阳性率（18%），提示咽拭子标本的 HCMV gB 巢式 PCR 检测优于脐血标本。

脐血 HCMV pp65 抗原血症检测为“金标准”^[12]。为了探讨咽拭子 PCR 检测在新生儿先天性 HCMV 感染筛查中的应用价值，本研究针对其中 18 份脐血标本，抽提白细胞进行 pp65 抗原血症检测。结果显示，pp65 抗原血症检测 6 例阳性，阳性率为 33%；巢式 PCR 检测新生儿咽拭子 HCMV gB 阳

性 7 例，阳性率为 39%。两种检测方法一致率为 72%，分析得出新生儿咽拭子 PCR 检测的灵敏度和特异性分别为 67% 和 75%；其阳性预测值和阴性预测值分别为 57% 和 82%。两种方法的阳性检出率差异无统计学意义，提示巢式 PCR 用于检测咽拭子标本的 HCMV gB 与脐血 HCMV pp65 抗原血症的阳性检测的结果无差异，且新生儿咽拭子的采取无创、简便易行，适合作为新生儿 HCMV 先天性感染筛查的检测标本。然而本研究标本数量有限，咽拭子巢式 PCR 真正服务于临床还需要今后扩大研究的标本量，来进一步验证。对于咽拭子病毒基因检测阳性的新生儿，应该作为重点随访对象，以利于在患儿语言发育的关键阶段进行监测和干预，更好的指导治疗。

[参 考 文 献]

- [1] Nigro G, Adler SP. Cytomegalovirus infections during pregnancy[J]. Curr Opin Obstet Gynecol, 2011, 23(2): 123-128.
- [2] 中华医学会儿科学分会感染消化组. 巨细胞病毒感染诊断方案[J]. 中华儿科杂志, 1999, 37(7): 441.
- [3] Pignatelli S, Dal Monte P, Rossini G, Landini MP. Genetic polymorphisms among human cytomegalovirus (HCMV) with-type strain[J]. Rev Med Virol, 2004, 14(6): 383-410.
- [4] Korver AM, de Vries JJ, Konings S, de Jong JW, Dekker FW, Vossen AC, et al. Congenital cytomegalovirus infection in young children with permanent bilateral hearing impairment in the Netherlands[J]. J Clin Virol, 2009, 46(Suppl 4): S27-S31.
- [5] Dollard SC, Schleiss MR. Screening newborns for congenital cytomegalovirus infection[J]. JAMA, 2010, 304(4): 407-408.
- [6] Yague V, Cour I, Kanaan A, Alvarez R, Fernandez C, Picazo J, et al. Cytomegalovirus: comparative study of diagnostic techniques[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin, 1998, 16(4): 163-168.
- [7] Nyholm JL, Schleiss MR. Prevention of maternal cytomegalovirus infection: current status and future prospects[J]. Int J Womens Health, 2010, 2: 23-35.
- [8] Boppana SB, Ross SA, Shimamura M, Palmer AL, Ahmed A, Michaels MG, et al. Saliva Polymerase-Chain-Reaction Assay for Cytomegalovirus Screening in Newborns[J]. N Engl J Med, 2011, 364(22): 2111-2118.
- [9] 李霄, 陈贻骥, 李禄全. 巨细胞病毒感染新生儿听力损害与尿液病毒负荷量的相关性研究[J]. 中国当代儿科杂志, 2011, 13(8): 617-620.
- [10] 任鹏, 姚娟, 金艳, 李法锦, 葛俊, 汪晓婷, 等. 新生儿咽拭子检测在诊断单纯疱疹病毒感染中的意义[J]. 安徽医科大学学报, 2012, 47(7): 813-815.
- [11] 刘翔腾, 桂兰, 罗序锋, 陈玉兰, 欧俊斌, 黄娟, 等. 儿童社区获得性肺炎病原微生物分布特点分析[J]. 中国当代儿科杂志, 2013, 15(1): 42-45.
- [12] 张睿, 刘新质. 孕妇巨细胞病毒感染及其宫内传播的探讨[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 1999, 15(3): 166-169.

（本文编辑：王庆红）