

·临床研究报道·

应用荧光定量聚合酶链反应动态 观察新生儿巨细胞病毒感染

单若冰¹,于海青¹,谭丽群¹,张玉华¹,蒋玉红²

(青岛市妇女儿童医疗保健中心 1. 新生儿科; 2. 儿科研究所, 山东 青岛 266011)

[摘要] 目的 探讨新生儿先天性巨细胞病毒感染后病毒转阴的规律及抗病毒治疗的效果。方法 经外周血定量 CMV-PCR 检测确定 CMV 感染的 37 例足月新生儿,分为阿昔洛韦组 and 对照组,并每 4 周 1 次进行定量 CMV-PCR 动态观察以确定病毒转阴时间。结果 37 例 CMV 感染中 12 周内阴转 25 例,占 67.6%,阿昔洛韦治疗组和对照组阴转时间差异无显著性。结论 先天性 CMV 感染多数在 4 周内血中病毒转阴,阿昔洛韦治疗无明显疗效。

[关键词] 巨细胞病毒感染;聚合酶链反应;婴儿,新生

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** B **[文章编号]** 1008-8830(2003)03-0249-02

人类巨细胞病毒(cytomegalo virus, CMV)是先天性病毒感染中较常见的病原,受感染的新生儿出生时大多无症状,但少数将来可表现神经性耳聋、语言学习能力下降等神经系统缺陷^[1]。尽管诊断手段日臻完善和多样化,但病毒检测何时转阴、临床是否需要早期干预争议很大。本文应用荧光定量聚合酶链反应技术(定量 PCR)对感染的新生儿进行了动态观察,以探讨巨细胞病毒在体内消失时间及抗病毒治疗的效果。

1 对象和方法

1.1 对象

为 1999 年 7 月至 2000 年 1 月 289 例出生 6 h 至生后 3 d 的黄疸住院新生儿,对其均进行外周血定量 CMV-PCR 检测,其中 37 例阳性,诊断为先天性 CMV 感染^[2]。男 24 例,女 13 例,ABO 溶血症 5 例,高胆红素血症 12 例,吸入性肺炎 12 例,新生儿窒息 6 例,其余 2 例。均系母乳喂养。

37 例分为阿昔洛韦治疗组(19 例)和对照组(18 例),治疗组每日给予阿昔洛韦 10 mg/kg 口服,共 10~14 d。两组均每 4 周 1 次进行定量 CMV-PCR 动态观察以确定病毒阴转时间。其中 29 例同时检测母亲血液 CMV-IgM、生后 4 周测母亲乳汁 CMV-DNA。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 入院第 2 天采集外周静脉血 0.5 ml 送检。定量 PCR 检查:使用全自动荧光检测仪(VM0481,德国产)和中山医科大学达安基因诊断中心提供的 FQ-PCR 检测试剂盒进行检测。扩增引物及荧光探针:引物序列为:P1 5'-TTT AGA TAT CCT AGA TAA GGT TCA T-3', P2 5'-TCT TAA AAG ATC TTC TGG GAA TAA GTG-3',产物长度为 235 bps,荧光探针序列为:5'-AGC CAT CCA CAT CTC CGG CTT ATC CTG-3'。

1.2.2 质量控制 CMV 阳性定量质控标准品为经标定的 CMV 标准定量血清梯度;CMV 阴性定量质控标准品为无菌生理盐水。

1.2.3 方法 标本处理采用常规的碱裂解法从血清中提取 CMV DNA。总反应体系为 40 μ l,各反应管放入 PE7700 自动荧光 PCR 仪进行扩增,反应条件为:93 预变性 2 min 后,按 93 45 s,55 120 s 共 40 个循环,反应结束后电脑自动分析计算定量结果。

1.2.4 酶联免疫吸附试验(ELISA)法 检测新生儿、母亲血特异性 CMV-IgM,试剂盒由中国预防医学科学院提供,操作按说明书进行。

1.3 统计学处理

χ^2 检验。

[收稿日期] 2002-08-30; [修回日期] 2003-01-21

[作者简介] 单若冰(1961-),女,大学,主任医师。主攻方向:新生儿专业。

2 结果和分析

2.1 新生儿外周血 CMV-DNA 颗粒含量和 CMV-IgM 阳性率

使用定量 CMV-PCR 检测 CMV-DNA 颗粒最高为 100×10^4 DNA 颗粒/ml, 最低为 0.062×10^4 DNA 颗粒/ml, 平均 $(37.54 \pm 16.39) \times 10^4$ DNA 颗粒/ml。37 例中 CMV-IgM 阳性者 9 例, 占 24.3%。

2.2 新生儿外周血 CMV-DNA 动态变化

37 例 CMV 感染中, 4 周、8 周、12 周血 CMV 阴转(血中定量 CMV-PCR 检测 CMV-DNA 为 0)分别为 7 例、13 例、5 例。12 周内阴转 25 例, 占 67.6%; 12 周后仍未阴转者 12 例, 占 32.4%。

2.3 母血 CMV-IgM 及乳汁 CMV-DNA 检测

两组共测定母亲血 CMV-IgM 29 例, 阳性 17 例, 占 58.6%; 乳汁定量 CMV-DNA 26 例, 阳性 10 例, 占 38.5%。乳汁中 DNA 最高为 47.0×10^4 DNA 颗粒/ml, 最低为 0.05×10^4 DNA 颗粒/ml, 平均 $(16.3 \pm 5.9) \times 10^4$ DNA 颗粒/ml。

2.4 阿昔洛韦的治疗效果

阿昔洛韦治疗组 19 例, 12 周内阴转 14 例, 占 73.7%; 对照组 18 例, 12 周内阴转 11 例, 占 61.1%, 两组比较差异无显著性 ($\chi^2 = 0.67$, $P > 0.05$)。

3 讨论

CMV 感染是新生儿先天性感染最常见的病原微生物之一, 有症状的新生儿 CMV 感染(肝炎综合征)往往能被临床医生所重视, 对无症状感染往往漏诊。有观察发现, 尽管新生儿先天性感染 90% 为无症状感染, 但其中仍有 5%~17% 将来遗留听力障碍、语言学习困难等神经系统后遗症^[2~4]。由于对病毒能否自动阴转不清楚、目前无特效的抗病毒药物和抗病毒药物本身的毒副作用及许多医院实验室进行 PCR 时存在标本污染、使诊断的可信度大打折扣等诸多因素的存在, 造成临床对新生儿先天性无症状性 CMV 感染是否需要早期干预治疗争议较大。

本文应用的荧光定量 PCR 技术融汇 PCR 和

DNA 探针杂交技术的优点, 直接探测 PCR 过程中荧光信号的变化, 根据 PCR 酶反应动力学特点, 获得 DNA 模板的准确定量结果。整个实验过程均在完全闭管的状态下进行, 无需 PCR 后处理和冗长的电泳检测, 解决了常规 PCR 实验不能定量及扩增产物污染而导致的假阳性、操作繁杂等问题, 可以准确定量出高至 10^{10} , 低至 0 个拷贝数的病原体, 实验结果准确可靠。而新生儿和小婴儿产生 IgM 能力较差, 可产生假阴性, 单纯依靠特异性 IgM 诊断易漏诊, 如本文资料, 定量 PCR 阳性者中仅 24.3% CMV-IgM 阳性。

本研究病例标本取自生后 3 d, 当属先天性感染, 尤其是母亲血液 IgM 也阳性者, 更加支持诊断。本文研究的先天性 CMV 感染, 多数病例在 4 周以内病毒转阴。当然因无孕母体 CMV 感染监测指标, 尚难以推断胎儿在母体内感染时间, 母亲 CMV-IgM 阳性的病例可认为系孕晚期的感染。另外, CMV 感染者体内病毒 DNA 颗粒数量差别非常大, 但本研究并不能证实病毒 DNA 颗粒数量与阴转时间呈正性相关关系, 尚需积累病例进一步观察。治疗组和对照组短期内病毒转阴时间无明显差别, 提示无环鸟苷对促进 CMV 病毒阴转并无明显的临床效果。

综上所述, 本文研究证实了先天性 CMV 病毒感染后血中病毒颗粒数量差异较大, 多数病例可在较短时间内转阴, 阿昔洛韦对此治疗效果并不明显。定量 PCR 技术检查新生儿 CMV 感染, 方便、准确, 不失为一种有效方法。

[参 考 文 献]

- [1] Boppana SB, Pass RF, Britt WJ. Symptomatic congenital cytomegalovirus infection: neonatal morbidity and mortality [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 1992, 11(5): 93-95.
- [2] 董永绥, 方峰, 张明整理. 巨细胞病毒感染诊断试行标准 [J]. *中华儿科杂志*, 1995, 33(1): 8-9.
- [3] Alford CA, Stagno S, Pass RF, et al. Congenital and perinatal cytomegalovirus infections [J]. *Rev Infect Dis*, 1990, 12(Suppl 7): S745-S753.
- [4] 邓先捷, 李易娟, 曾瑜, 等. 先天性巨细胞病毒感染的临床研究 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2002, 4(1): 39-40.

(本文编辑: 吉耕中)