维普资讯 http://www.cqvip.com

人巨细胞病毒感染的实验室诊断及进展

胡昌智 吴洁如

（湖南医科大学病毒研究室，长沙 410078）

关键词：巨细胞病毒 诊断 抗原检测 抗体检测 DNA杂交

Development of Laboratory Diagnosis of Human Cytomegalovirus Infection

Hu Chang-zhi Wu Jie-ru

(*Laboratory of Virology, Hunan Medical University, Changsha 410078*)

Key Words: Cytomegalovirus Diagnosis Antigen detection Antibody detection DNA hybridization

巨细胞病毒（CMV）属疱疹病毒β亚科，分布广泛，在人及其他哺乳动物中感染非常普遍。在人类中，人巨细胞病毒（HCMV）感染率约为40—100%，但多数为隐性感染。新生儿中，平均有1%受感染，在经济条件较差的国家，感染率更高(2—3%)[1]。无论是显性还是隐性先天性HCMV感染，都可造成婴儿不同程度的损害[2]。免疫损害的病人可发生严重的或致死性的HCMV感染[3,4]。目前，随着新的抗病毒药物的发现及其在临床上广泛应用，HCMV感染的实验室诊断就显得愈加重要。由于HCMV在人纤维母细胞中产生细胞病变（CPE）慢，病毒分离不符合临床早期诊断的要求，需要有新的、快速、敏感的方法取代。本文就HCMV感染的实验诊断及新近进展作一概述。

1. 细胞病理学检查

巨细胞病毒感染几乎遍及全身各器官、组织并造成病理损害。在肝、肾、肺、胃肠、腮腺等组织中形成一种具有特征性的巨细胞即包涵体细胞[5,6]。用苏木素-伊红染色，此种细胞直径20—30μm，细胞核大且位于细胞一侧，核中心有嗜伊红的包涵体，包涵体外有晕圈，与核膜分界清楚，形似“猫头鹰眼”。由于细胞病理学方法简单，目前仍广泛用于诊断巨细胞包涵体病（CID）。1981年，愈善昌[7]对87例肝炎综合征患儿进行了尿沉渣细胞染色，查找包涵体细胞。33例包涵体细胞阳性（37.8%）。一般认为，尿液细胞学检查的敏感性较差，用此方法诊断CID可能造成不少病例漏诊。我们的经验表明，有相当数量的患者病毒分离阳性，但临床上检查尿沉渣细胞包涵体却为阴性。12例病毒分离阳性的病孩中，连续3次晨尿检查仅2例包涵体细胞阳性（16.6%）。这

本文于1989年6月2日收到。

维普资讯 http://www.cqvip.com

可能与尿沉渣细胞中包涵体细胞的量以及病理染色技术、观察者熟练程度有关。将荧光素标记的抗 HCMV 单克隆抗体用于组织切片、尿沉渣细胞或支气管灌洗液（BAL）脱落细胞免疫学染色可提高检测阳性率[8,9]。总之，单用细胞学方法诊断 HCMV 感染敏感性差。但在没有病毒分离条件的医院，此法仍可作为一种诊断手段。

2. 病毒分离及方法改进

1956年，Smith[10]成功地用人子宫肌纤维母细胞分离出一株巨细胞病毒。正式确定巨细胞病毒作为 CID 的病因。由于 HCMV 培养成功，人们对它的生物学特性有了较详细的了解，并对 HCMV 感染的流行病学作了详细研究。1984年，郭永建[11]用病毒分离方法对 HCMV 的母婴传播途径进行了研究。结果表明，部分妊娠妇女通过阴道、唾液、乳汁向体外排病毒，造成婴儿宫内、产道、出生后 HCMV 感染。1987 年，吕绳敏[12]对182例肝炎综合征患儿作了病毒分离和血清学检查。病毒分离及/或血清学检查阳性者92例（50.55%）。由于巨细胞病毒在纤维母细胞中增殖周期长，产生 CPE 缓慢，病毒分离不能作为早期快速诊断方法，通常用来作回顾性调查。

在对 HCMV 的研究中，不少学者发现低速离心、二甲亚砜（DMSO）、地塞米松（Dex）等因素能增强病毒感染性，加快病毒复制，提早 CPE 的出现[13-16]。将低速离心、DMSO、Dex 应用于病毒分离，不仅提早 CPE 的出现，同时也提高了分离阳性率[17,18]。这是常规病毒分离方法的一大改进。

3. 标本中 HCMV 抗原的直接检测

间接血凝抑制试验已用于 HCMV 抗原的检测，此方法能检测到 10^3TCID_{50} 病毒含量，但较烦琐[19]。1987年，Zerbini[20] 用免疫酶法检测标本中 HCMV。将 0.2ml尿标本印在硝酸纤维膜上，用抗 HCMV 晚期蛋白的单克隆抗体以间接免疫酶法染色。87 份尿标本中，10份阳性（11.5%），与病毒分离完全相符。近年来，ELISA 和酶联免疫化学发光技术（CELISA）已用于直接检测标本中HCMV。Naqvi[21]用ELISA检测经-70℃ 冻存后的尿标本中 MCMV，其敏感性为 84.4%。Mckeating[22]用 ELISA 检测 HCMV，可检测出 $10^{2.3}TCID_{50}$ 的病毒含量。但新鲜标本中由于存在β_2微球蛋白（β_2MG），影响了标本中 HCMV抗原与抗体反应，从而降低了ELISA 检测的阳性率。因此，ELISA 不宜用作新鲜尿标本的 HCMV 检测[23]。Pronovost[24] 用 CELISA检测HCMV，能检测出$10^{0.3}TCID_{50}$ CMV。其敏感性比 ELISA 提高50 倍。当 HSV、VZV 含量达 $10^{4.4}TCID_{50}$ 时仍无交叉反应。可见 CELISA 是一种很敏感、特异的方法。

4. 细胞培养中早期核抗原的检测

CMV 感染细胞后 2 ～20小时，在病毒 DNA 和结构蛋白合成之前就产生立即早期蛋白（Immediate early antigens，IEAs）和早期蛋白（Early antigens，EAs）。由于IEA和 EA 出现早，用抗早期蛋白单克隆抗体或阳性血清能达到快速检测细胞培养中 HCMV 的目的。常用的检测方法是直接或间接免疫荧光或免疫酶法。Gleaves[25] 用间接免疫荧光和免疫酶法检测了162份尿标本。尿标本接种于 MRC-5细胞，培养36小时后检测巨细胞病毒早期核抗原（HCMV-EV），HCMV-EA阳性19份，其中 1 份病毒为阴性。与病毒分离比

维普资讯 http://www.cqvip.com

较，此方法的敏感性为100%，特异性为94.4%。HCMV-EA检测与低速离心法合用能增加检测的阳性率。Thiele[26]报告低速离心组HCMV-EA阳性细胞比不用离心组高11倍。DMSO和Dex处理细胞后能否增加HCMV-EA检出率报道不一[27,28]。目前生产抗HCMV-EA单克隆抗体的厂家和单克隆抗体的种类较多。不同单克隆抗体针对不同早期蛋白或同一早期蛋白的不同抗原决定簇，因而其敏性和特异性有差异[29]。检测HCMV-EA时，几种单克隆抗体混合使用可提高检出率。HCMV-EA检测具有较高的敏感性和特异性，且检测时间比病毒分离明显缩短，是早期快速诊断HCMV感染的较好方法。

5. DNA杂交检测HCMV DNA

放射性同位素及生物素标记的HCMV AD169株DNA探针已较多地应用于标本中HCMV DNA检测。目前从HCMV AD 169DNA中克隆出的内切酶片段不少于30种[30-32]。不同限制性内切酶片段的敏感性和特异性有差异。较常用的EcoRI J片段和HindⅢL及J片段等。DNA杂交多采用原位杂交和点杂交两种方法。

原位杂交一般用于检测活检或尸检组织及细胞培养中的HCMV DNA，且多用生物素标记的探针[33,34]。Sorbello[35]将原位杂交用于检测细胞培养的HCMV DNA，检测HCMV AD169时，以0.1mol/L感染细胞，DNA杂交阳性需培养5天，而HCMV-EA阳性仅需24小时，用于检测临床标本时，DNA杂交需培养72小时出现阳性，而HCMV-EA检测只需17小时。可以说原位杂交检测细胞培养中HCMV不如HCMV-EA敏感，而且培养时间长。

DNA点杂交可直接检测标本中HCMV DNA。点杂交方法既可用放射性同位素标记的探针，也可用生物素标记的探针[36]。目前同位素标记的探针应用较多。Augustin[32]将DNA点杂交用于临床，并与病毒分离和HCMV-EA检测方法进行比较。以EcoRI J及HindⅢ L片段作为探针，检测了122份尿标本。15份病毒分离及DNA杂交均为阳性。5份分离阳性但DNA杂交仅其中一种探针出现阳性。3份分离阳性但DNA杂交为阴性。6份杂交阳性而分离阴性。DNA杂交与病毒分离的符合率为91%。作者认为没有证据说明DNA杂交出现假阳性。因为一方面高纯度探针本身具有高度特异性，另一方面这6份标本与载体M_{13}噬菌体DNA探针杂交未出现交叉反应。出现这种现象的原因很可能是由于HCMV在体内某些组织细胞中持续性感染而产生大量mRNAs并排出体外，但无感染性病毒颗粒产生。从尿中排出的mRNA能与探针杂交而出现阳性信号，病毒分离则出现假阴性。Vonsover[37]将临床标本接种于细胞，培养48小时后从细胞中提取DNA，再与探针杂交（放大DNA杂交）。25例病人中，10例常规DNA杂交或病毒分离阳性，而放大DNA杂交17例阳性。只有1例病毒分离阳性而放大DNA杂交为阴性。放大DNA杂交比常规DNA杂交法敏感性有显著提高。虽然DNA杂交具有较高的敏感性和特异性，但也存在许多缺点，如DNA杂交需要较好的条件和设备以及同位素污染问题等，使临床广泛使用受到限制。预计生物素标记的探针将代替同位素探针广泛用于临床。

自1985年Saiki[46]首次创建"多聚酶链锁反应"（Polymerase Chain Reaction，PCR）方法以来，一些学者将PCR方法用于病毒DNA检测[47-49]。PCR能检测出极微量病毒DNA或DNA片段（100fg～10fg DNA量），其敏感性比常规DNA杂交方法提

维普资讯 http://www.cqvip.com

高10,000～100,000倍。Huang* 已将 PCR 方法应用到CMV DNA检测，敏感性也很高。

6. 免疫电镜检测HCMV

免疫电镜不仅能鉴定病毒，而且能直接观察到病毒颗粒大小和形态，现已广泛用于甲肝病毒、轮状病毒的快速鉴定。1987 年，Anderson[38]用免疫扫描电镜检测 HCMV，全部过程仅需2 小时，与其他病毒无交叉反应。Vonsover[37] 用免疫电镜检测标本中HCMV，结果与病毒分离一致，由于电镜技术需要特殊设备，不适于检测大量临床标本及普遍应用，多用于新分离病毒株的快速鉴定。

7. 血清抗体的检测

血清中 HCMV 特异性抗体的检测对诊断 HCMV 感染有很大帮助。目前补体结合试验（CF）、间接血凝试验（IHA）、间接免疫荧光试验（IFA）、酶联免疫吸附试验（ELISA）、乳胶凝集试验、中和试验及固相放射免疫（RIA）等方法都已用于检测 HCMV 抗体。不同方法的敏感性和特异性各有不同。补体结合试验和间接血凝试验检测血清总抗体，敏感性也较差。ELISA 和 IFA[39,40]用于检测 IgG 或 IgM 等抗体，具有较高的敏感性和特异性。由于巨细胞病毒能诱导细胞 Fc 受体的表达[41]，血清中非特异性 IgG 能与 Fc 受体结合，IFA 易出现假阳性。用感染病毒的细胞核制备抗原[45] 或用补体结合间接免疫荧光可减少假阳性。ELISA 则不受 Fc 受体影响，而且方法简单、检测程序标准化，是检测 HCMV-IgG 理想的方法。血清中 HCMV-IgG 阳性只能说明有过感染，只有当 HCMV-IgG 阳转或双份血清 IgG 滴度 4 倍增加时才说明近期急性感染；对早期诊断无意义。

由于IgM产生早、消失快和不能通过胎盘的特点，血清HCMV-IgM检测对感染早期诊断具有较大价值。新生儿血清或脐血 HCMV-IgM 阳性说明新生儿宫内感染。Nielsen[42] 的研究结果表明，血清 HCMV-IgE 对感染早期诊断比 IgM 更敏感。作者检测了 92 份来自38名 HCMV 感染的新生儿血清标本，IgE 的敏感性为82%，而IgM仅为66%。血清抗体动力学测定[43]，原发 HCMV 感染其 IgG、IgM、IgA、IgE 滴度均有增加。而再发感染病人有 IgG 滴度增加及持续 IgM阳性，但很少 IgE 及 IgA阳性。可以认为HCMV-IgE、IgA 不能用于再发感染的早期诊断。而 IgM、IgE 对先天性、原发性感染的早期诊断有较大价值。严重HCMV感染病人血清中，IgM也可能呈阴性。IFA、RIA 等方法检测 HCMV-IgM 受类风湿因子（RF）的影响[44]。RF阳性血清需经免疫吸附除去 RF后再测IgM。近期HCMV 感染，血清中抗 HCMV-EA 抗体滴度升高而且长期存在，因此不能作为急性感染的指标[45]。

8. 巨细胞病毒感染类型的确定

巨细胞病毒感染后转归主要依赖于机体的免疫状况。免疫机能正常的个体，原发性HCMV感染后，病原可能被全部清除也可能在体内某些组织细胞内潜伏下来[50]，当机体免疫功能下降时，潜伏状态的病毒可被激活[51]。机体免疫机能低下的个体，HCMV 感染

*Huang ES.1989年4月来湖南医科大学讲学记录。

维普资讯 http://www.cqvip.com

后通常转化为慢性持续性感染，从唾液、尿及其他分泌物中排放病毒时间可达数月至数年。HCMV感染后机体产生抗体和建立特异性细胞免疫。但这种免疫状况的建立能否抵抗再感染尚不清楚，目前尚未见到HCMV再感染的报道。HCMV感染类型的诊断对其致病性及流行病学研究有一定意义。（1）原发性感染可根据患者血清IgG抗体阳转及特异性IgM抗体阳性作出初步判断[52]。新生儿、婴幼儿的HCMV感染多为原发性感染。（2）激活感染多发生于免疫功能低下的患者如AIDS病人、器官移植及肿瘤患者。此类病人血清特异IgG抗体为阳性。由于潜伏状态的病毒被激活，血清IgG抗体滴度升高，IgM抗体为阳性或阴性。用核酸序列分析方法对近期分离株和以往分离株DNA进行比较，两株病毒DNA具有同源性[53]。用SDS-聚丙烯酰胺电泳对病毒株的结构蛋白进行分析也能显示同源性。（3）慢性持续性HCMV感染用检测血清抗体的方法对诊断意义不大[54]。对病人长期随访，病人长期或间歇地从唾液、尿等分泌物中排放病毒可以确定诊断。核酸杂交方法及免疫电镜方法在区别近期感染、激活感染及持续性感染三种情况时无意义。

9. 小结

HCMV感染在人类中普遍存在。新生儿、婴幼儿、免疫抑制状态的患者易发生HCMV感染。因此，快速作出实验室诊断具有重要意义。目前，HCMV感染的实验室诊断方法很多。其中以HCMV-EA检测应用广泛，而且敏感性及特异性均较高。低速离心能提高HCMV-EA检出率，两者合用是快速检测HCMV的理想方法。ELISA及DNA杂交方法敏感性不如HCMV-EA检测。免疫电镜多用于新分离病毒株的快速鉴定。血清中HCMV-IgM、IgE检测对感染早期诊断有很大帮助，但不能了解病人排病毒的状况，确诊仍需用病毒分方法，确定HCMV感染类型关键在于对病人进行血清学、病原学方面的追踪，而DNA杂交、免疫电镜方法对感染类型的诊断无意义。

参考文献

〔1〕 Krech U et al., 1981, *Bull WHO* 59(4): 605.
〔2〕 Pass RF et al., 1980, *Pediatrics* 66: 758.
〔3〕 Panjwan DD et al., 1985, *J Med Virol* 16: 357—359.
〔4〕 Watson JG et al., 1983, *J Clin Pathol* 36: 683—692.
〔5〕 Smith MG et al., 1951, *Am J Clin Pathol* 21: 50—55.
〔6〕 Fetterman GH et al., 1952, *Am J Clin Pathol* 22: 424—425.
〔7〕 愈善昌, 1981, 医学通讯, 10: 8—10.
〔8〕 Hackman RC et al., 1985, *J Infect Dis* 151(2): 325—329.
〔9〕 Cordonnier C et al., 1987, *J Infect Dis* 155(3): 496—500.
〔10〕 Smith MG et al., 1956, *Proc Soc Exp Biol Med* 92: 424—426.
〔11〕 郭永建, 1986, 湖南医科大学学报 10(1): 1—5.
〔12〕 吕绳敏, 1987, 中华传染病学杂志 5(4): 198—201.
〔13〕 Hudson JB et al., 1978, *Virol* 72: 235—243.
〔14〕 Tanaka J et al., 1984, *Virol* 136: 448—451.
〔15〕 Tanaka J et al., 1984, *J Gen Virol* 65(10): 1759—1767.

维普资讯 http://www.cqvip.com

〔16〕 Tanaka J et al., 1985, *Virol* 148(2): 165—176.
〔17〕 郭建平, 1989, 湖南医科大学学报 14(1): 26—98.
〔18〕 Agha SA et al., 1988, *J Med Virol* 26: 85—92.
〔19〕 Black SB et al., 1983, *J Lab Clin Med* 101(3): 450—454.
〔20〕 Zerbini M et al., 1987, *J Clin Microbiol* 25(11): 2197—2199.
〔21〕 Naqvi SH et al., 1886, *J Med Virol* 18: 139—147.
〔22〕 Mckeating JA et al., 1986, *J Med Virol* 16: 367—373.
〔23〕 Mckeating JA et al., 1986, *Ibid* 18: 341—348.
〔24〕 Pronovost AD et al., 1982, *J Clin Microbiol* 16: 345—349.
〔25〕 Gleaves CA et al., 1984, *Ibid* 19: 917—919.
〔26〕 Thiele GM et al., 1987, *J Virol Meths* 16: 327—329.
〔27〕 Thiele GM et al., 1988, *Ibid* 22: 319—328.
〔28〕 Espy MJ et al., 1988, *J Clin Microbiol* 26(6): 1091—1093.
〔29〕 Randazzo DN et al., 1988, *Ibid* 26(2): 369—371.
〔30〕 Richman D et al., 1984, *J Infect Dis* 150(6): 941—944.
〔31〕 Lurain NS et al., 1986, *J Clin Microbiol* 24(5): 724—730.
〔32〕 Augustin S et al., 1987, *J Clin Microbiol* 25(10): 1973—1979.
〔33〕 Janssen HP et al., 1987, *J Virol Meths* 17: 311—318.
〔34〕 Myerson D et al, 1984, *Human Pathol* 15: 430—439.
〔35〕 Sorbello AF et al., 1988, *J Clin Microbiol* 26(6): 1111—1114
〔36〕 Olive DM et al., 1988, *J Virol Meths* 19: 289.
〔37〕 Vonsover A et al., 1987, *J Virol Meths* 16: 29—37.
〔38〕 Anderson J et al., 1987, *J Virol Meths* 16(4): 253—262.
〔39〕 Wielaard F et al., 1985, *Ibid* 10: 363—369.
〔40〕 Kangro HD et al., 1984, *J Med Virol* 14: 73—80.
〔41〕 Keller R et al., 1976, *J Immunol* 116: 3772.
〔42〕 Nielson SL et al., 1987, *J Clin Microbiol* 25(8): 1406—1410.
〔43〕 Nielson SL et al., 1987, *Ibid* 25(4): 654—657.
〔44〕 黄志严, 1988, 湖南医科大学学报 13(4): 341—343.
〔45〕 Friedman AD et al., 1982, *Infect Immun* 38(3): 1068—1072.
〔46〕 Saiki RK., 1985, *Science* 230: 1350—1354.
〔47〕 Salimans, MMM., 1989, *J. Virol. Meths.* 23(1): 19—28.
〔48〕 Shibata DK., 1988, *J Exp Med* 167(1): 225—230.
〔49〕 Kwok S et al., 1987, *J Virol* 61: 1690—1694.
〔50〕 Schrier RD et al., 1985, *Science* 230, 1048—1051.
〔51〕 Gehrz RC., 1981, *J Infect Dis* 143: 391—395.
〔52〕 Drew WL., 1988, *Review of Infection Dis* 10(S3): S468—S476.
〔53〕 Winston DJ., 1985, *Ann Intern Med* 102: 16—20.
〔54〕 Griffiths PD., 1988, *J Virol Meths* 21: 79—86.