

16-19

第8卷第1期
1993年3月中国病毒学
VIROLOGICA SINICAVol.8 No.1
Mar. 1993

用PCR法检测献血员单个核细胞中的CMV-DNA

孟潞英 周宗海* 张文炳 彭华国

(第一军医大学微生物学教研室, 广州 510515)

提 要

107份自愿献血者新鲜血标本和22份库存血标本分别用PCR检测单个核细胞中巨细胞病毒DNA (CMV-DNA) 和用ELISA检测其血浆中CMV-IgG。结果CMV-DNA阳性率达80.4%和77.3%, CMV-IgG阳性率为65.9%。其中CMV-IgG阳性者, 基本上都携带CMV-DNA; CMV-IgG阴性者, 亦有部分携带CMV-DNA。因此认为献血员血液中CMV高带毒率应引起临床有关部门的高度重视; PCR是筛选无传播CMV危险性血液制品的最可靠方法。

关键词: 自愿献血者 巨细胞病毒 聚合酶链反应

R446.119
R

单个核细胞 检测

输血是传播巨细胞病毒 (Cytomegalovirus, CMV) 的重要途径, 经输血感染CMV可致早产儿和新生儿严重疾患甚至死亡^[1], 对血清抗体阴性的免疫力低下病人、孕妇和器官移植受体也具有极大的威胁^[2]。判断献血员和血液是否具有传播CMV的危险性, 以前因检测手段有限, 主要采用血清学方法。近年来有报道用DNA杂交法探讨献血员血液中CMV带毒状况^[3,4]。我们用聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction, PCR) 检测了107份献血员新鲜血标本和22份血库血标本单个核细胞中CMV-DNA, 亦比较CMV-IgG检出结果, 从DNA分子水平揭示了献血员血液中CMV的带毒状况, 为血源的应用及质量的提高提供新的理论指导。

材 料 与 方 法

一、标本: 南方医院血库当日献血者新鲜抗凝血107份和血库库存血22份, 每份1—2 ml。用淋巴细胞分离液 (密度1.077g/ml, 上海试剂二厂) 分离单个核细胞层, 继之抽提DNA: 加10% SDS至终浓度为0.5%, 37℃水浴30min, 先后用等体积水饱和重蒸酚和氯仿/异戊醇 (24:1) 抽提2次, 去蛋白; 加1/10体积NaAc (3mol/L, pH5.2) 和2.5体积无水乙醇沉淀DNA; 用75%乙醇洗涤2次后真空抽干, 加50μl TE (10mmol/L Tris-HCl, 0.1mmol/L EDTA-Na₂, pH8.0) 溶解DNA。

本文于1991年1月29日收到, 1992年7月30日修回。

* 第一军医大学附属南方医院烧伤科, 广州510515。

二、PCR试验:引物对的设计与合成均同前^[6];

P1: 5'-dGCAGAGCTCGTTTAGTGAACC-3'

P2: 5'-dGGCÁCGGGGAATCCGCGTTCC-3'

在0.5ml Eppendorf管中加入下列试剂(总量50 μ l):引物-1(P1,60ng/ μ l)1 μ l,引物-2(P2,60ng/ μ l)1 μ l, dNTP(2mmol/L)5 μ l, 10 \times buffer 5 μ l, 待测样品5 μ l, 无菌三蒸水补足至50 μ l。上述混合物100 $^{\circ}$ C煮沸10min后加Taq DNA聚合酶(Promega Corp. USA)1.25u/管 再加一滴无菌石蜡油覆盖液面。用PCR仪(ER1COMP INC. USA)扩增,循环温度时间为94 $^{\circ}$ C 60S \rightarrow 55 $^{\circ}$ C 45S \rightarrow 72 $^{\circ}$ C 90S,共进行35个循环,最后一个循环时72 $^{\circ}$ C延长5min。

取10 μ l扩增产物进行3%琼脂糖凝胶电泳,溴化乙锭(1 μ g/ml)染色后紫外灯下观察特异的DNA带(133bp)。

三、对照:HCMV阳性对照为人胚肺二倍体细胞培养的CMV-AD₁₀₀标准株DNA;阴性对照为单纯疱疹病毒(HSV)DNA、EB病毒DNA和正常人胚肺细胞(HEL)DNA。

四、ELISA试验:每份血液标本在分离单个核细胞以前取血清用ELISA Kit(北京解放军302医院病毒室)检测其CMV-IgG,方法参照试剂盒说明。

结 果

一、CMV-PCR的特异性和敏感性

在已建立的实验条件下^[8],用PCR仪进行试验,获得良好的特异性和敏感性结果。所有阴性对照(HSV-DNA、EBV-DNA、HEL-DNA)扩增后均未见电泳带,只有阳性对照CMV-AD₁₀₀ DNA扩增后产生特异的133bp DNA电泳带。用HCMV-AD₁₀₀-DNA-EcoR1 J片段定量检测,PCR最小检出量为0.1fg DNA片段,相当于6个基因拷贝。

二、PCR和ELISA检测献血者新鲜血标本结果

PCR检测107份献血者新鲜血液单个核细胞中CMV-DNA的阳性率为80.4%(86/107);同时检测22份血库库存血的CMV-DNA阳性率为77.3%(17/22)。两者之间无明显差异。ELISA检出CMV-IgG阳性率为65.9%(70/107),比较PCR和ELISA检测献血员血标本结果(见表),发现CMV-IgG阳性者,CMV-DNA检出也基本阳性(66/70),只有4

例例外,CMV-IgG阴性者,单个核细胞中CMV-DNA检测则有20/37为阳性(占54%),有17/37为阴性(占46%)。

表 PCR和ELISA检测自愿献血者新鲜血标本结果

Tab The results of detecting fresh blood specimens from blood donors by PCR and ELISA

	PCR(检测CMV-DNA) PCR(Detecting CMV-DNA)		总 计 Total
	阳性 (Positive)	阴性 (Negative)	
ELISA 阳性 (检测CMV-IgG) Positive	66	4	70
ELISA (Detecting CMV-IgG) Negative	20	17	37
总计 (Total)	86	21	107

讨 论

本文通过 PCR 检测 129 份血液标本, 揭示了献血员血液中 CMV-DNA 阳性率可高达 77.3%—80.4%, 所得结果与 Stanier^[6]和 Morris^[7]所做过的少量标本的类似试验相近。如 Stanier 用 PCR 检测了 30 份献血员血标本 CMV-DNA 阳性率为 83% (25/30)。也有人的类似研究获得较低的 CMV-DNA 检出率^[8,9]。其原因除了可能与不同地区人群差异有关外, 主要与方法学有关。首先 PCR 是至今检测病原最敏感的手段, 其敏感性比 DNA 杂交法高 10000 倍^[6], 故张平等用地高辛标记探针检测正常供血者白细胞中 CMV-DNA 阳性率为 48.3% (29/60)^[3]。再者, CMV 感染人体后, 血液白细胞为其潜伏的主要场所^[8], 而在血清中含量极少, 故王秀坤等人用核酸杂交法检测献血员血清中 CMV-DNA 只获 4.3% (2/46) 的阳性率^[4]。由此可见, 采用 PCR 技术, 合理地选择和

处理标本, 有利于如实反映献血员血液中 CMV 带毒状况。同时还发现献血员新鲜血液与库存血标本中 CMV-DNA 带毒率之间无明显差异 (80.4%—77.3%)。虽然有人从分离培养结果推测新鲜血比库存血更容易传播 CMV^[1], 但由于 CMV 感染可由潜伏感染的细胞传播, 而新鲜血和库存血 CMV 带毒率无异, 故具有传播 CMV 的同等危险性。

结果显示, CMV-IgG 阳性者大多数携带 CMV-DNA (66/70), 少数未能测到 CMV-DNA (4/70) 可能是由于抽提 DNA 方法不当, 或其它技术问题而导致假阴性。此外如果标本中待检 CMV-DNA 保守序列有所变化, 也会导致扩增失败, 出现假阴性。故有人建议用两对以上引物筛选标本以防漏检。

另一方面, CMV-IgG 阴性者, 体内单个核细胞中也有 20/37 携带 CMV-DNA。CMV-IgG 阴性携带 CMV-DNA 者是一种带毒状态, 表明曾感染过 CMV, 经过一段时间后血清反应阴转, 但 CMV-DNA 仍潜伏在单个核细胞中。以往筛选血清抗体阴性血液制品不能杜绝发生输血后的 CMV 感染^[10]可能与此有关。因此, 血清学方法虽可间接地反映血液制品的带毒状况, 但由于敏感度低, 不足以筛选完全安全的血液制品, 尚可用 PCR 法予以补充。

总之, 本文用 PCR 方法从分子水平揭示了献血员血液传播 CMV 的危险性, 建议在特殊需要情况下, 可用 PCR 法筛选血制品, 以降低输血后 CMV 感染的发生率。

参 考 文 献

- [1] Adler SP, et al., 1986, *Pediatr Infect Dis*, 5: 239.
- [2] Meyers JD, et al., 1986, *J Infect Dis*, 153: 478.
- [3] 王平等, 1991, 中华传染病杂志, (9): 201.
- [4] 王秀坤等, 1991, 中华血液学杂志, (12): 213.
- [5] 孟璐英等, 1991, 第一军医大学学报, (11): 323.
- [6] Stanier P, et al., 1989, *BMJ*, 299: 897.
- [7] Morris DJ, et al., 1989, *BMJ*, 299: 1164.
- [8] Hirsch MS, et al., 1984, *Brith Defects*, 20: 161.

[9] Dworkin RJ, et al., 1990, *J Infect Dis*, 161: 1310.

[10] Browden RA, et al., 1987, *Transfusion*, 27: 478.

Detection of Cytomegalovirus DNA in Mononuclear Cells from Blood Donors by PCR

Meng Luying Zhou Zonghai Zhang Wenbing Peng Huaguo

(The First Medical College of PLA, Guangzhou 510515)

107 fresh blood specimens and 22 blood specimens from the blood bank were detected by polymerase chain reaction (PCR) and ELISA. The positive percentage of detecting CMV DNA in the leukocytes of the blood specimens by PCR is 77.3—80.4%. Meanwhile the positive percentage of CMV-IgG in the plasma by ELISA is 65.9%. CMV-DNA was always persisted in the blood specimens that is seropositive. When CMV-DNA was negative, some of them carried CMV-DNA. It is concluded that people should pay more attention to the serious situation of blood products carrying CMV, and PCR is the most reliable method for screening CMV-DNA negative blood products.

Key words: Volunteer Blood Donor Cytomegalovirus(CMV)
Polymerase Chain Reaction(PCR)

欢迎参加How-to函授

中国科学院对外交流与外语应用培训中心是经湖北省教委批准的国内首家专门从事“对外交流与外语应用”交叉研究、教育培训的机构。目前正开展函授业务,全国招生,由中央电视台《国际交流How-to》节目主讲,该中心主任胡庚申副译审组织教学。通讯地址:武昌小洪山,中科院武汉分院双外培训中心;邮编:430071,电话:(027)723712转657。