

献血员巨细胞病毒感染的研究*

R373.9

李春英¹, 吕春兰², 喻东威², 张利平¹, 赛文¹, 吴秉仁¹ R457.1¹(内蒙古自治区卫生防疫站, 呼和浩特 010020)²(内蒙古自治区中心血站, 呼和浩特 010010)

摘要:用 PCR 法和 DNA 杂交法检测同一献血员的白细胞及血清中的 HCMV-DNA, 并用 ELISA 法检测血清中的 HCMV-IgM、IgG(测四个滴度), 连续两年共检测白细胞和血清样本各 200 人份。PCR 法检测白细胞中的 HCMV-DNA 阳性率分别为 63% 和 70%, DNA 杂交法检测的阳性率为 42% 和 50%。PCR 法检测血清中的 HCMV-DNA 的阳性率为 49% 和 53%, DNA 杂交法检测的阳性率为 33% 和 39%。HCMV-IgM 阳性率两年均为 5%。HCMV-IgG 阳性率分别为 54% 和 58%。

关键词:献血员; 白细胞; 血清; 巨细胞病毒; 抗体

中图分类号: R373.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-5125(2000)02-0111-05

HCMV-IgG. HCMV感染. PCR.
DNA杂交

人类巨细胞病毒(Human Cytomegalovirus, HCMV)感染在免疫功能正常的健康人极少出现临床症状, 而在免疫功能低下或缺失的患者可能会发展成有严重临床症状的 CMV 病。输血是 HCMV 感染的主要途径之一^[1]。HCMV 感染可导致死胎、早产、畸形、新生儿巨细胞包涵体病和间质性肺炎等多种疾病, 并与器官移植排斥反应有关。为了解献血员中 HCMV 感染状况以及寻找一种比较简便的实验方法, 我们采用 PCR 法和 DNA 杂交法检测了同一献血员的白细胞及血清, 并与血清中检出的 HCMV-IgG、IgM 抗体结果比较, 发现 HCMV-DNA 的检出与 HCMV-IgG 抗体的检出有很高的一致性。因此, 我们提出可用 HCMV-IgG 抗体作为 HCMV 感染的指标, 现将结果报道如下:

1 材料与方 法

1.1 病毒标本 在内蒙古自治区中心血站采集经 ALT、HBsAg、抗-HCV、抗-HIV、RPR 等检测阴性的同一献血员血清、全血各 100 人份, 共采两年。用自然沉降法分离外周血液中的白细胞。血清、白细胞置低温冰箱保存。

1.2 HCMV-DNA 提取 取待测样品 100 μ L 与等量裂解液混匀, 经消化、煮沸、离心后, 取各实验所需量分别进行 PCR 和 DNA 杂交实验。

1.3 试剂来源 PCR 扩增试剂盒、DNA 杂交试剂、ELISA 试剂盒均购自北京京师生物工程技术有限公司。操作及结果判定均按试剂说明进行。

收稿日期: 1998-12-16, 修回日期: 1999-03-24

* 基金项目: 内蒙古自治区卫生厅科研发助项目(NWK960027)

作者简介: 李春英(1958年-), 女, 河南省方城县人, 副主任检验师, 学士, 主要从事医学病毒学研究。

2 结果

2.1 献血员中 HCMV-DNA 阳性率

采用 DNA 杂交法及 PCR 法对连续两年采集的献血员血清及同份血样白细胞各 100 人份进行 HCMV-DNA 检测。1996 年献血员白细胞中 HCMV-DNA 检出率为 42% (DNA 杂交法) 和 63% (PCR 法), 血清中 HCMV-DNA 检出率为 33% (DNA 杂交法) 和 49% (PCR 法)。1997 年献血员白细胞中 HCMV-DNA 检出率为 50% (DNA 杂交法) 和 70% (PCR 法), 血清中 HCMV-DNA 的检出率为 39% (DNA 杂交法) 和 53% (PCR 法)。对两种方法的灵敏度进行比较, 显示 PCR 法检测白细胞和血清 HCMV-DNA 的阳性率均高于 DNA 杂交法 ($X^2 = 8.84, 5.29, 8.33, 3.94, P < 0.05$)。采用 PCR 法在白细胞中检出的 HCMV-DNA 阳性率明显高于血清中的 HCMV-DNA 阳性率 ($X^2 = 3.98, 6.10, P < 0.05$), 而用 DNA 杂交法检测白细胞及血清中的 HCMV-DNA, 其阳性率则基本一致 ($X^2 = 1.73, 2.44, P > 0.05$)。检测结果见表 1。

表 1 献血员白细胞及血清中 HCMV-DNA 检测结果
Table 1 Examination of HCMV-DNA in leukocytes and sera of blood donors

| 时间 Time (年, a) | 检测数 Sample numbers | | 阳性数 Positive numbers | | | |
|----------------------|-----------------------|-------------|------------------------------|-------------|---------------------|-------------|
| | 白细胞 Leukocyte | 血清 Serum | DNA 杂交法 DNA hybridization | | PCR 法 PCR method | |
| | | | 白细胞 Leukocyte | 血清 Serum | 白细胞 Leukocyte | 血清 Serum |
| 1996 | 100 | 100 | 42(42.0) | 33(33.0) | 63(63.0) | 49(49.0) |
| 1997 | 100 | 100 | 50(50.0) | 39(39.0) | 70(70.0) | 53(53.0) |
| 合计 Total | 200 | 200 | 92 | 72 | 133 | 102 |

2.2 献血员中 HCMV 特异性抗体检测

采用 ELISA 法对连续两年的献血员血清进行了 HCMV-IgG、HCMV-IgM 检测。1996 年血清中的 IgG 阳性检出率分别为 54% (1:100, 1:400), 38% (1:1 600), 16% (1:6 400)。1997 年血清中的 IgG 阳性检出率分别为 58% (1:100, 1:400), 47% (1:1 600), 17% (1:6 400)。两年的血清 IgM 阳性检出率均为 5%。在这 10 份 IgM 阳性的血样中, 3 份血样的白细胞及血清中均检出了 HCMV-DNA (PCR 法), 同时 HCMV-IgG 也阳性。其余的 7 份血样, 仅用 PCR 法在白细胞中检出了 HCMV-DNA。

2.3 PCR 法检测 HCMV-DNA 与 ELISA 法检测 HCMV 特异性抗体的关系

比较用 PCR 法及 ELISA 法 (1:100 或 1:400), 检测 1996、1997 年各 100 人份血样结果。1996 年的血样中, 有 44 份在白细胞及血清中均检出了 HCMV-DNA, 且其血清中的 HCMV-IgG 抗体也阳性。而在用 PCR 法检出 HCMV-DNA 的 63 份白细胞血样中, 有 49 份在血清中检出了 HCMV-IgG, 符合率为 77.8%。在剩下的 5 份 IgG 阳性样品中, 用其他检测法在血清或白细胞中也检测到了 HCMV-DNA, 其血样中 HCMV-DNA 的阳性数与血清中 IgG 抗体的符合率为 85.7%。同样在 1997 年的 51 份血样中, 白细胞及血清中同时检测到了 HCMV-DNA 及 HCMV-IgG 抗体, 在用 PCR 法检出的 HCMV-DNA 的 70 份白细胞血样中, 有 54 份血清中 HCMV-IgG 抗体也阳性, 符合率为 77.1%。同样在剩下的 4 份 IgG 阳性样品中, 用其他

检测法在血清或白细胞中也检测到了 HCMV-DNA, 其 HCMV-DNA 的阳性数与 IgG 抗体的符合率为 82.9%。将血清中 HCMV-IgG 抗体阳性数以及将 HCMV-IgG 与 HCMV-IgM 抗体阳性数之和, 与用目前敏感性最强的 PCR 法在同份血样检出 HCMV-DNA 阳性数最高的白细胞中的阳性数相比, 结果见表 2。

表 2 PCR 法检测 HCMV-DNA 与 ELISA 法检测 HCMV 抗体结果比较

Table 2 Comparison of PCR and ELISA for HCMV examination

| 时间 Time (年, a) | PCR Positive numbers | | | ELISA Positive numbers | | |
|----------------------|-------------------------|-------------|-----------------------|---------------------------|-----|-----------------------|
| | 白细胞 WBC | 血清 Serum | 白细胞及血清 WBC & Serum | IgG | IgM | IgG + IgM |
| 1996 [*] | 63 | 49 | 44 | 54(85.7) [*] | 5 | 58(92.1) [*] |
| 1997 [*] | 70 | 53 | 51 | 58(82.9) [*] | 5 | 61(87.1) [*] |

白细胞和血清检测数均为 100 人份

100 samples for dection of leukocyte and serum

* 与白细胞中 PCR (+) 的符合率

* Corresponding rate with PCR (+) in leukocyte

2.4 献血员血清中 HCMV-IgG 抗体与被检者性别及献血年限的关系

对 200 名献血员按献血年限(1~2, 3~4, 5~6, 7~8, 9~10, 10 以上)进行分组, 其献血年限与 HCMV-IgG 抗体阳性的分布见表 3。从表 3 可看出, 献血员中 HCMV-IgG 阳性率随献血年限增加而增高, 而与性别无显著性关系。

表 3 献血员血清中 HCMV-IgG 抗体与献血者性别及献血年限的关系

Table 3 Relationships between HCMV-IgG and sexuality of donor and duration of donation

| 献血年限(年) Duration(a) | 男 Male | | | 女 Female | | | 合计 Total | | |
|------------------------|------------|---------------|--------------------|-------------|---------------|--------------------|-------------|---------------|--------------------|
| | 例数 Case | 阳性数 Posit. | 阳性率(%) Posit. % | 例数 Case | 阳性数 Posit. | 阳性率(%) Posit. % | 例数 Case | 阳性数 Posit. | 阳性率(%) Posit. % |
| 1~2 | 13 | 3 | 23.0 | 3 | 0 | 0 | 16 | 3 | 18.8 |
| 3~4 | 15 | 5 | 33.3 | 14 | 2 | 14.3 | 29 | 7 | 24.1 |
| 5~6 | 19 | 8 | 42.1 | 16 | 7 | 43.8 | 35 | 15 | 42.9 |
| 7~8 | 21 | 11 | 52.4 | 16 | 11 | 68.8 | 37 | 22 | 59.5 |
| 9~10 | 18 | 12 | 66.8 | 7 | 6 | 85.7 | 25 | 18 | 72.0 |
| >10 | 34 | 27 | 79.4 | 24 | 20 | 83.3 | 58 | 47 | 81.0 |
| 合计 Total | 120 | 66 | 55.0 | 80 | 46 | 57.5 | 200 | 112 | 56.0 |

3 讨论

早在 1985 年就有人认为白细胞是 HCMV 的重要潜伏部位之一, 临床经验也表明, 接受白细胞输入的患者, 其 HCMV 感染的危险性显著增加^[2]。但在 1996 年 Hackstein^[3]等人用免疫细胞化学法及反转录 PCR 法并未证明献血员白细胞是 HCMV 的主要潜伏场所。他们认为经输血传播 HCMV 的可能原因是极少的吞噬细胞暂时吞噬了受感染内皮细胞中的 HCMV。而 1998 年 Larsson^[4]等人发现, 对 HCMV 敏感的单核白细胞均携带有 CD13 表面分子, 并采用针对 HCMV 两个特殊基因的引物设计的 PCR 法证实了这一设想, 因而提出 HCMV 仅在携带 CD13 的外周单核白细胞中复制。而我们的实验结果表明, 用 PCR 法检测白细胞与血清中的

HCMV-DNA, 其阳性检出率有显著差异, 而采用 DNA 杂交法, 其阳性检出率无明显差异。检出率的不同主要与方法学有关。

聚合酶链反应技术(PCR 法)被认为是目前敏感度高的基因检测手段之一, 其较高的 HCMV 阳性检出率在白细胞及全血中均有报道^[5,6]。但我们应用 PCR 试剂盒, 在连续 2 年的献血员血清及白细胞中, HCMV-DNA 的检出率分别是 49% 和 53%, 63% 和 70%。我们所用的 PCR 法其引物采用相对保守区域的一对基因片段, 以出现 170 bp 的 DNA 扩增带为感染阳性。而目前使用的各种检测 HCMV 的 PCR 试剂, 扩增后的阳性指示条带有多种(435、160、400 bp 等等)。因此, 我们认为出现这种不同阳性率的原因, 可能与不同 PCR 方法的引物不同有关。

输血是造成 HCMV 感染的主要原因之一, 一般认为供血者的血液是否具有感染性, 主要看其血液中是否有 HCMV-DNA。我们采用 ELISA 法对献血员的血清进行 HCMV-IgG、IgM 检测, 其 IgM 的检出率与国内外报道的基本一致^[7,8]。IgG 的检出率在两年中分别为 54% 和 58%。与国内多数报道 IgG 的阳性率 86%~98% 相比, 我们测到较低 IgG 阳性率可能与所用试剂有关。但 1973 年 Krech^[9]报道世界五大洲献血员的 HCMV 的抗体阳性率在西欧、美国、澳大利亚为 40%~79%, 第三世界国家则高达 81%~100%, 并且认为同一国家的不同地区 HCMV 抗体阳性率也可能有很大变化, 且 HCMV 抗体阳性率与营养状况、居住条件等有一定关系。根据我们的调查结果, 将 IgG 的阳性率与白细胞和血清中的 HCMV-DNA 的检出率相比, 两者之间具有高度的一致性。HCMV-IgM 阳性一般反映近期感染, HCMV-IgG 阳性则表明既往感染。因此, 我们认为可用 ELISA 法检测 HCMV-IgG、IgM 抗体作为高危献血员的常规筛检方法, 这对减少和避免输血后 CMV 感染, 尤其是对预防器官移植者、免疫功能低下者、小儿、孕妇以及未育女性的感染更为重要。此方法操作简便、快速、易于标准化、准确性高, 也容易为基层医务人员所掌握。

参 考 文 献

- [1] Griffiths PD. Current management of cytomegalovirus diseases [J]. *Med Virol*, 1993, (Suppl 1):106
- [2] Schrier RD, Nelson JA, Oldstone MB. Detection of human cytomegalovirus in peripheral blood lymphocytes in a natural [J]. *Science*, 1985, 230:1048
- [3] Hackstein H, Bottcher K, Merz H, *et al.* Blood leukocytes are not a primary latent site of cytomegalovirus [J]. *Beitr Infusionsther Transfusionsmed*, 1996, 33:235~240
- [4] Larsson S, Soderberg-Naucler C, Moller E. Productive cytomegalovirus (CMV) infection exclusively in CD13-positive peripheral blood mononuclear cells from CMV-infected individuals: implications for prevention of CMV transmission [J]. *Transplantation*, 1998, 65(3):411~415
- [5] Stanier P, Kitchen AD, Taylor DL, *et al.* Detection of human cytomegalovirus in peripheral mononuclear cell and urine samples using PCR [J]. *Mol Cell Probes*, 1992, 6(1):51~58
- [6] 陈金东, 邱定红, 单祥年, 等. 献血员中巨细胞病毒感染的 PCR 检测[J]. *中华血液学杂志*, 1994, 5(15):254~255
- [7] Wilhelm JA, Matter L, Schopfer K. The risk of transmitting CMV to patient receiving blood transfusion [J]. *J Infect Dis*, 1986, 154:169
- [8] 赵澄泉, 邢济钧. 青岛地区献血员 HCMV 特异性抗体检测[J]. *中华流行病学杂志*, 1989, 10:78
- [9] Krech U. Complement fixing antibodies against cytomegalovirus in different parts of the world [J]. *Bull WHO*, 1973, 49:103

Study on Human Cytomegalovirus (HCMV) Infection in the Blood Donors

LI Chun-ying, LU Chun-lan, YU Dong-wei *et al.*

(Inner Mongolia Health and Anti-epidemic Station, Huhhot 010020)

Abstract: HCMVs in blood leukocytes and in serum from the same blood donor were examined by polymerase chain reaction (PCR) and DNA hybridization technique. In the mean time, HCMV-IgM and HCMV IgG in the serum were examined by ELISA. Two hundred blood leukocyte samples and 200 serum samples were examined in a successive two years period. HCMV positive rates for the blood leukocytes by PCR in the different years were 63% and 70% while the positive rates by DNA hybridization were 42% and 50%, respectively. HCMV positive rates for the serum by PCR in the different years were 49% and 53% while the positive rates by DNA hybridization were 33% and 39%, respectively. A 5% HCMV-IgM positive rate was found in the two years while 54% and 58% HCMV-IgG positive rates were found in the two different years.

Key words: Blood donor; Leukocyte; Serum; HCMV; Antibody