

US3 基因检测在新生儿晚期黄疸巨细胞病毒感染诊断中的应用

胡洪波^{1a} 陈坤² 彭巧英^{1b} 郭虹^{1a}

1. 湖北省妇幼保健院 a. 检验科; b. 新生儿科 (武汉 430070); 2. 武汉市第九医院检验科 (武汉 430080)

摘要: 目的 探讨 US3 基因检测在新生儿晚期黄疸巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)感染诊断中的应用。**方法** 应用巢式 PCR 法检测 2012 年 1 月-2012 年 12 月在新生儿科就诊的新生儿晚期黄疸标本 US3 基因, 并通过与 HCMV-IgM、HCMV-DNA 荧光定量 PCR、HCMV-pp65 抗原检测结果做比较, 分析 US3 基因检测在诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的符合程度。**结果** ① 145 例新生儿晚期黄疸血清 HCMV-IgM 检测阳性 1 例, HCMV 荧光定量 PCR 检测阳性 24 例, HCMV-pp65 抗原阳性 25 例, US3 基因扩增阳性 24 例; ② US3 基因检测与 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 两种检测方法结果差异无统计学意义 ($P = 1.000$), 一致率为 97.2%, κ 值为 0.900; US3 基因检测与 HCMV-pp65 抗原检测两种检测方法结果差异无统计学意义 ($P = 1.000$), 一致率为 95.2%, κ 值为 0.828; ③ US3 基因检测用于诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的灵敏度为 85.2%, 特异度为 99.2%, Youden 指数为 84.4; 阳性预测值和阴性预测值分别为 0.958 和 0.967; ④ US3 基因检测用于诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 活动性感染的灵敏度为 84.0%, 特异度为 97.5%, Youden 指数为 81.5; 阳性预测值和阴性预测值分别为 0.875 和 0.967。**结论** US3 基因检测适用于临床新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的诊断。

关键词: 巨细胞病毒; US3 基因; 新生儿; 黄疸

Application of US3 gene in detection of human cytomegalovirus infection collected from late jaundice infants

HU Hong-bo, Chen Kun, PENG Qiao-ying, GUO Hong

1a. Department of Clinical Laboratory; 1b. Department of Neonatology, Hubei Maternal and Child Health Hospital, Wuhan 430070, China; 2. The Ninth Hospital of Wuhan, Wuhan 430080, China

Abstract: Objective To explore the application of US3 gene in detection of human cytomegalovirus infection collected from late jaundice infants. **Methods** Nested PCR was performed to amplify the US3 gene region of clinical strains collected from late jaundice infants. By comparing with the results of serum HCMV-IgM, HCMV-DNA PCR and HCMV-pp65 antigenemia assay, the coincidence degree of the results in detection of human cytomegalovirus strains collected from late jaundice infants was analyzed. **Results** ① 145 specimens of late jaundice infants were detected, the positive specimens detected by serum HCMV-IgM were 1, detected by PCR HCMV-DNA and HCMV-pp65 were 24 and 25 respectively. By comparison, the positive specimens detected by the US3 HCMV-DNA were 24. ② There was no significant difference in detection of HCMV infection between US3 gene and PCR HCMV-DNA ($P = 1.000$). The consistent rate of US3 gene and HCMV-DNA PCR was 97.2% and the value of Kappa was 0.900; There was no significant difference in detection of HCMV infection between US3 gene and HCMV-pp65 ($P = 1.000$). The consistent rate of US3 gene and HCMV-pp65 was 95.2% and the value of Kappa was 0.828; ③ The sensitivity of US3 gene in detection of HCMV strains collected from late jaundice infants was 85.2%, the specificity was 99.2%, Youden index was 84.4, PVP and PVN were 0.958 and 0.967 respectively. ④ The sensitivity of US3 gene in detection of HCMV strains collected from late jaundice infants was 84.0%, the specificity was 97.5%, Youden index was 81.5, PVP and PVN were 0.875 and 0.967 respectively. **Conclusions** For optimal sensitivity and specificity of the diagnostic method, the parallel use of primers from the US3 gene is recommended.

Keywords: human cytomegalovirus; US3 gene; infant; jaundice

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV) 属疱疹病毒科 β 亚科, 为双链 DNA 病毒, 临床表现多样, 是新生儿感染的重要病原之一。在我国, HCMV 感染的新生儿中以黄疸就诊的患儿居多, 黄疸持续时间从数天到数月不等^[1,2]。早期诊断、及时治疗对新生儿黄疸预后至关重要。HCMV 基因组全长约 240kb, 含有 200 多个开放读码框, 由长独特序列 (UL) 和短独特序列 (US) 2 个片段组成, 两个片段被一对方向倒置的重复序列夹在中间。HCMV US3 蛋白感染早期即有表达, 在内质网中与 HLA-I 类分子 α 链结合, 阻止和下调特异性 CD8⁺CTL 的正常免疫效应。本研究应用巢式 PCR 法检测就诊新生儿晚期黄疸标本 US3 基因, 并通过与血清 IgM 型抗体、HCMV-DNA 荧光定量 PCR 和 HCMV-pp65 抗原

作者简介: 胡洪波 (1977-), 男, 博士, 副主任技师, 主要从事免疫学检验, Email: dingguang666@hotmail.com。

通讯作者: 郭虹 (1965-), 女, 副主任技师, 主要从事免疫学检验, Email: lan.1206@163.com。

检测结果做比较，分析 US3 基因检测在诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 感染及活动性感染的符合程度。

1 对象和方法

1.1 研究对象 2012 年 1 月-2012 年 12 月在新生儿科就诊的新生儿晚期黄疸 145 例，符合以下条件者纳入研究对象：日龄≥1 周，以黄疸持续不退和/或退而复现为主诉。所有患儿行宫内感染（TORCH）、肝功能、肝炎病毒、血常规、血型、C 反应蛋白、肝胆 B 超检测；对高间胆红素血症者，排除血型不合溶血后，光疗效果不佳者再做溶血性贫血（网织红细胞、高铁血红蛋白还原试验、红细胞形态检查、红细胞脆性试验等），血清 HCMV-IgM、HCMV-DNA 荧光定量 PCR 和 HCMV-pp65 抗原检测。HCMV 感染诊断标准参照第三版《实用新生儿学》^[3]。

1.2 试剂与仪器 采用秀鹏生物技术开发有限公司 HCMV-pp65 抗原血症免疫荧光检测试剂盒检测人外周血白细胞 pp65 抗原；采用康润生物制品开发有限公司 HCMV 检测试剂盒检测 HCMV-IgM；使用美国 BIO-RAD ICycler Iq 型基因扩增仪对本标本进行 DNA 定量检测。采用中山大学达安基因股份有限公司 PCR 荧光检测 HCMV 试剂盒检测 HCMV-DNA。

1.3 方法

1.3.1 血清 HCMV-IgM 检测 酶联免疫吸附试验（ELISA）检测血清中 HCMV-IgM 抗体，严格按照试剂盒说明书要求进行操作，ISR≥1.10 判定为 HCMV-IgM 抗体水平显著。

1.3.2 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测 取患儿静脉血 1ml 于 1.5ml 的无菌离心管，4℃静置过夜。吸取上层血清至另一无菌离心管。取 50 μl 血清加 50 μl DNA 提取液打匀。100℃保温 10 分钟。12000rpm 离心 5 分钟，取上清液 3.5 μl 做 PCR 扩增。HCMV-DNA 拷贝数≥5×10²判定为阳性。

1.3.3 HCMV-pp65 抗原检测 取患儿静脉抗凝血 3ml，溶血素溶解红细胞，取 2×10⁵个细胞制片。荧光显微镜下观察结果。以 2×10⁵个多形核白细胞中 pp65 抗原阳性细胞≥3 个判定为阳性。

1.3.4 US3 基因检测 采用巢式聚合酶链反应扩增 HCMV US3 基因，引物设计和反应条件参照文献^[4]，外侧引物 P1：5′-TGAGCAGCCATAGCACCAGAGTCC-3′，P2：5′-CAGTCCACACGCTACTTCTCAGCG-3′；内侧引物 P3：5′-CCCGCGCCTGGGTGTTAGAGTCCG-3′，P4：5′-GCACTGCTGCAGCCAGACCGGAGCG-3′。初次扩增反应条件：预变性 94℃12min，变性 94℃30s，退火 60℃30s，延伸 72℃90s，50 循环，再延伸 94℃7min；再次扩增反应条件：预变性 94℃12min，变性 94℃30s，退火 65℃30s，延伸 72℃90s，40 循环，再延伸 94℃7min。扩增产物 561bp。1.5%琼脂糖凝胶电泳、溴化乙锭染色，紫外检测仪下观察扩增结果。

1.4 统计学分析 用 SPSS16.0 统计软件，配对计数资料采用 χ^2 检验和 κ 系数检验； $\kappa \geq 0.7$ 表示吻合度较强； $0.7 > \kappa \geq 0.4$ 表示吻合度一般； $\kappa < 0.4$ 表示吻合度较弱， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 新生儿晚期黄疸荧光定量 PCR 检测、HCMV-pp65 抗原及 US3 基因扩增结果 145 例新生儿晚期黄疸血清 HCMV-IgM 检测阳性 1 例，HCMV 荧光定量 PCR 检测阳性 24 例，HCMV-pp65 抗原阳性 25 例，US3 基因扩增阳性 24 例。荧光定量 PCR 检测、HCMV-pp65 抗原及 US3 基因扩增结果见表 1。

表 1 28 例阳性患儿 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测、HCMV-pp65 抗原及 US3 基因扩增结果

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
IgM	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
PCR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+
pp65	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
US3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+	+

2.2 US3 基因检测与 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果的比较 US3 基因检测与 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 两种检测方法结果差异无统计学意义（ $P = 1.000$ ），一致率为 97.2%， κ 值为 0.900，US3 基因检测与 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果参见表 2。

表 2 US3 基因检测与 HCMV-DNA 荧光定量 PCR 检测结果的比较

HCMV-DNA (+)	HCMV-DNA (-)	合计
--------------	--------------	----

US3(+)	22	2	24
US3(-)	2	119	121
合计	24	121	145

2.3 US3 基因检测与 HCMV–pp65 抗原检测结果的比较 US3 基因检测与 HCMV–pp65 抗原检测两种检测方法结果差异无统计学意义($P=1.000$)，一致率为 95.2%， κ 值为 0.828。US3 基因检测与 HCMV–pp65 抗原检测结果的比较 US3 基因检测与 HCMV–pp65 抗原检测结果参见表 3。

表 3 US3 基因检测与 HCMV–pp65 抗原检测结果的比较

	HCMV–pp65 (+)	HCMV–pp65 (-)	合计
US3(+)	21	3	24
US3(-)	4	117	121
合计	25	1	145

2.4 US3 基因检测与新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的比较 US3 基因检测用于诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的灵敏度为 85.2%，特异度为 99.2%，Youden 指数为 84.4；阳性预测值和阴性预测值分别为 0.958 和 0.967。US3 基因检测与新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的结果比较参见表 4。

表 4 US3 基因检测与新生儿晚期黄疸 HCMV 感染的比较

	HCMV 感染(+)	HCMV 感染(-)	合计
US3(+)	23	1	24
US3(-)	4	117	121
合计	27	118	145

2.5 US3 基因检测与新生儿晚期黄疸 HCMV 活动性感染的比较 US3 基因检测用于诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 活动性感染的灵敏度为 84.0%，特异度为 97.5%，Youden 指数为 81.5；阳性预测值和阴性预测值分别为 0.875 和 0.967。US3 基因检测与新生儿晚期黄疸 HCMV 活动性感染的结果比较参见表 5。

表 5 US3 基因检测与新生儿晚期黄疸 HCMV 活动性感染的比较

指标	HCMV 活动性感染(+)	HCMV 活动性感染(-)	合计
US3(+)	21	3	24
US3(-)	4	117	121
合计	25	120	145

3 讨论

本研究中 145 例新生儿晚期黄疸血清 HCMV–IgM 检测阳性仅 1 例,用于诊断 HCMV 感染的灵敏度为 3.7%，与相关文献报道一致^[5]，我们认为血清 HCMV–IgM 检测不适宜用于新生儿 HCMV 感染的检测。原因可能有：（1）新生儿免疫系统发育不完善,感染 HCMV 后没有形成 IgM 应答；（2）围产期感染 HCMV，血清抗体一般在感染后 2–3 周后才产生，在症状早期抗体无法检测到；（3）部分患儿病毒负荷量相对较低。

HCMV–DNA 的转录和翻译受基因调控,具有严格的时相性,可分为即刻早期、早期和晚期基因，HCMV 在感染宿主 1 小时后即刻早期基因即开始表达,其他基因的表达在即刻早期蛋白的作用下启动。US3 是 HCMV 表达的一种立即早期糖蛋白，通过检测 US3 基因来确定 HCMV 的存在,是 HCMV 感染的有力证据^[6]。我们的前期研究证实该基因片段相对保守^[7]，巢式 PCR 法的应用也提高了该片段检测的特异性。结果显示，US3 基因检测与 HCMV–DNA 荧光定量 PCR 检测结果一致率为

97.2% ($\kappa=0.900$), 表现出良好的一致性。pp65基因作为早、晚期抗原在感染周期的早、晚期均有表达,是活动性HCMV感染时外周血白细胞中的主要抗原,多形核白细胞中的HCMV–pp65抗原血症已被公认为活动性感染的重要标志。US3基因检测与HCMV–pp65抗原检测一致率为95.2% ($\kappa=0.828$), 同样表现出较高的一致性。

临床上将从外周血白细胞中查得 HCMV 抗原,如 IEA、EA 或 pp65 等,任何一项抗原检测阳性时,即可诊断 HCMV 活动性感染。而检测到 HCMV–DNA 特异片段,只能表明 HCMV 感染,不能区分活动性或潜伏性感染。因此,本研究将 HCMV–DNA 荧光定量 PCR 和 HCMV–pp65 抗原两者作为参考系,比较 US3 基因检测在诊断新生儿晚期黄疸 HCMV 感染以及 HCMV 活动性感染的符合程度。二者 Youden 指数分别为 84.4 和 81.5,提示 US3 基因检测无论是在新生儿晚期黄疸 HCMV 感染或是活动性感染的诊断中都有较高的诊断价值。需要说明的是症状性感染的 HCMV 检出率要显著高于无症状感染的检出率^[8],本研究中所有受检患儿均为晚期黄疸患儿,症状明显,且排除部分病毒感染、溶血性贫血等其它可能导致黄疸症状的疾病,这也提高了 US3 基因检测 HCMV 的检出率及临床诊断的符合程度。

参考文献

1. 柳文菊,黄娥,谢良才.新生儿黄疸尿液与母乳人巨细胞病毒–DNA 配对检测结果分析[J].中华医院感染学杂志,2012,22(23):5206–5207.
2. 刘成程,钱东萌,王斌,等.利用 ELISA 与荧光定量 PCR 技术筛查新生儿巨细胞病毒感染水平及探讨与肝脏损害的相关性[J].现代生物医学进展,2013,13(7):1249–1252.
3. 金汉珍,黄德珉,官希吉.实用新生儿学[M].第3版.北京:人民卫生出版社,2003:319–324.
4. Garrigue I, Corte MF, Magnin N, *et al.* Variability of UL18, UL40, UL111a and US3 immunomodulatory genes among human cytomegalovirus clinical isolates from renal transplant recipients [J]. J Clin Virol, 2007, 40(2):120–128.
5. Neirukh T, Qaisi A, Saleh N, *et al.* Seroprevalence of Cytomegalovirus among pregnant women and hospitalized children in Palestine [J]. BMC Infect Dis. 2013,13(1):528.
6. Hesse J, Ameres S, Besold K, *et al.* Suppression of CD8+ T-cell recognition in the immediate-early phase of human cytomegalovirus infection [J]. J Gen Virol, 2013, 94(Pt 2):376–386.
7. 胡洪波,黄汉菊,彭巧英,等.人巨细胞病毒临床株 US3 基因 HLA–A*0201 限制性 CTL 表位预测[J].实用预防医学,2010,17(12):2374–2376.
8. Albanna EA, El-Latif RS, Sharaf HA, *et al.* Diagnosis of congenital cytomegalovirus infection in high risk neonates [J]. Mediterr J Hematol Infect Dis, 2013, 5(1).