联合检测巨细胞病毒感染在原位肝移植术后诊断的应用

韩 永,黄海燕,许晓光,肖 漓,周文强,冯 凯,蔡 明,石炳毅 (解放军第 309 医院全军器官移植中心研究室,北京 100091)

[摘 要] **目的** 比较外周血巨细胞病毒(CMV)定量 PCR 检测,CMV-pp65 抗原检测及组织病理学检查对原位肝移植术后 CMV 感染诊断的价值。**方法** 回顾分析 45 例肝移植患者临床资料,统计三种检查结果,并结合文献进行讨论。**结果** 三种方法检查均显示,有 18 例患者发生巨细胞病毒感染,18 例均为无临床症状的巨细胞病毒感染。经更昔洛韦治疗,18 例全部治愈。**结论** 外周血 CMV 定量 PCR,CMV-pp65 抗原检测及组织病理学检查均能作为肝移植术后 CMV 感染早期诊断的有效手段,CMV 定量 PCR 更敏感,CMV-pp65 抗原检测更特异,组织病理学检查则具有创伤性,三者的共同应用能够对 CMV 感染患者做出早期诊断并且指导治疗。更昔洛韦能够有效治疗 CMV 感染。

[关键词] 肝移植;巨细胞病毒感染;诊断;治疗

[中图分类号] R657.3 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)05-0510-03

Application of combined detection in diagnosis of cytomegalovirus infection after orthotopic liver transplantation

HAN Yong, HUANG Hai-yan, XU Xiao-guang, XIAO Li, ZHOU Wen-qiang, FENG Kai, CAI Ming, SHI Bing-yi (Research Department of Organ Transplant Center, 309th Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To compare the diagnostic value of cytomegalovirus (CMV) quantitative PCR, CMV-pp65 antigen test and histopathology in detection of CMV infection after orthotopic liver transplantation. **Methods** The clinical data of 45 patients who had received liver transplantation from July 2009 to October 2010 in our hospital were retrospectively analyzed along with literature review. **Results** The three methods indicated that asymptomatic CMV infection was occurred in all 18 patients and all of them were cured after the treatment of Ganciclovir. **Conclusion** CMV quantitative PCR, CMV-pp65 antigen test and histopathology can be the effective detecting methods for CMV at early stage after orthotopic liver transplantation. CMV quantitative PCR is more sensitive, CMV-pp65 is more specific and the results of histopathology examination is indubitable, although it is a little invasive. The combination of the three methods is effective in the diagnosis and treatment of CMV infection at early stage. Ganciclovir is effective in the treatment of CMV infection.

Keywords: liver transplantation; cytomegalovirus infection; diagnosis; treatment

人类巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染是肝移植术后常见的合并症,它通过多种途径影响移植器官和受者,增加移植受者的排斥和其他感染风险[1]。早期诊断患者 CMV 感染,对及时有效治疗、减少死亡率、提高移植疗效具有重要的意义。目前,检测 CMV 感染的主要方法有病毒培养、ELISA 法检测 CMV 特异性 IgM 抗体、CMV 定量 PCR 检测以及 CMV-pp65 抗原和组织病理学检测。本研究通过检测肝移植患者手术前后血中 CMV 定量 PCR 检测和 CMV-pp65 抗原以及移植肝标本组织学检查中 CMV 抗原的表达,评价其对 CMV 感染诊断的价值,探讨肝移植患者术后 CMV 诊断和防治方法。

[基金项目] "十一五"国家科技支撑计划基金项目(2008BAI60B04)

[作者简介] 韩 永(1972 -),男,北京市房山区人,副主任技师,硕士,主要从事移植病理学方面的研究。电话:(010)51520760

[通讯作者] 石炳毅,主任医师,教授,博士生导师,shibingyi@ medmail. com. cn

[收稿日期] 2011-04-19 [修回日期] 2011-05-11

1 资料与方法

1.1 临床资料

选取我院 2009 年 7 月至 2010 年 10 月肝移植受者 45 例(受体组),男 31 例,女 14 例,年龄 21 ~ 54 岁,平均 40 岁。供体组全部为健康献肝者。供体组、受体组均无全身感染性疾病,术前均未使用过抗病毒药物及免疫抑制剂治疗。供体组献肝前取血,供体肝移植前病理学检查。受体组术前常规取血检测 CMV 定量 PCR 及 pp65 抗原,术后 30 d 分别常规取血检测 CMV 定量 PCR 及 pp65 抗原及肝穿刺病理学检查。

1.2 仪器与方法

1.2.1 CMV 荧光定量 PCR 检测 使用美国 BIO-RAD 荧光定量 PCR 仪,CMV 荧光定量 PCR 试剂盒由上海之江生物科技有限公司提供。选取人巨细胞病毒株-AD169 基因组中编码即刻早期转录调节蛋白的 IE1 基因的一高度保守的非编码区为扩增靶区域,设计特异性引物及荧光探针,扩增片段长度为 86 bp。引物序列:F5'-GTGTATTGGGCTAACTAGCA-3', R5'-TCACTACTGCAGCTCCTT-3'。探针序列:5'-CATCCACATCTCCCGCTTATCCT-3'。DNA 提取试剂盒购自华美生物工程公司。

步骤:①按试剂盒说明书操作提取血清 DNA。②实时荧光定量 PCR 扩增。37 ℃ ×2 min,94 ℃ ×2 min,循环 1 次;再按 93 ℃ ×15 s,60 ℃ ×1 min,循环 40 次;在 60 ℃行单点荧光检测,反应体系为 40 μl。CMV-DNA 定量检测选用 FAM 通道。按照质控标准,结果以大于 1×10^3 copies/mL 判定为阳性。本试剂盒的线性检测范围:$10^3 \sim 10^7$ copies/mL。

1.2.2 CMV-pp65 抗原检测 CMV Brite 免疫荧光抗原血症试剂盒为荷兰 IQ 公司产品,CMV 抗原阳性和阴性对照玻片由试剂盒提供。步骤:①分离白细胞。取 EDTA 抗凝血 5 mL,采用右旋糖酐沉降法分离白细胞。②调整细胞浓度。用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)调整细胞浓度为 1.5×10^6/mL。③制备细胞涂片。④固定和破膜。⑤免疫荧光染色。加抗 pp65 混合单克隆抗体(C10/C11,1∶100 稀释),PBS 洗涤晾干后加入 FITC 标记的羊抗小鼠 IgG,置 37 ℃湿盒温育 30 min,PBS 洗涤后镜检。⑥读片和结果判断。用荧光显微镜观察结果,在镜下观察全部细胞,CMV-pp65 阳性细胞呈均匀的绿色、黄绿色,圆形、多叶的核染色。阳性结果判断:每 2×10^5 个白细胞中 CMV-pp65 阳性细胞数大于等于 1 个[2]。

1.2.3 肝组织活检 采用免疫组织化学 SP 法。组织切片常规脱蜡至水洗,3% 的过氧化氢处理 10 min 后,PBS 洗 3 次,每次 5 min;切片入枸橼酸钠缓冲液,加热至 95 ~ 100 ℃ 10 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;滴加封闭液(10% 山羊血清)15 min;加一抗 37 ℃ 1 ~ 2 h(阴性对照用 PBS 代替一抗);PBS 洗 3 次,每次 5 min;生物素标记二抗 37 ℃ 15 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;过氧化物酶(HRP)标记链霉卵白素 15 min;PBS 洗 3 次,每次 5 min;DAB 显色 3 min;水洗,苏木精复染,封固。

1.3 CMV 感染的防治

预防和治疗 CMV 感染均采用静脉注射更昔洛韦(ganciclovir)。预防方案:静脉注射更昔洛韦,5 mg · kg^{-1} · d^{-1},每日 1 次,共 1.5 个月。治疗方案:对于单纯 CMV 感染而无临床症状者,静脉注射更昔洛韦,5.0 ~ 7.5 mg · kg^{-1} · d^{-1},每日 1 次,共 3 个月;对于发生 CMV 病的患者,静脉注射更昔洛韦,5.0 ~ 7.5 mg · kg^{-1} · d^{-1},每日 2 次,至临床症状消失。

2 结果

2.1 肝移植患者术前检测结果

受体组均进行 EDTA 抗凝外周血 pp65 抗原检测,CMV 定量 PCR 检测均为阴性,受体组肝活检标本免疫组化检测结果 18 例为 CMV 阳性(图 1),27 例为阴性。供体组 EDTA 抗凝外周血 pp65 抗原检测,CMV 定量 PCR 检测及免疫组化结果均为阴性。

2.2 肝移植患者术后检测结果

术后 30 d 定量 PCR 检测结果为 14 例 CMV 阳性,其中 pp65 抗原检测 10 例阳性(图 2),14 例均为肝活检免疫组织化学染色阳性病例。

14 例 CMV 感染患者经治疗后,外周血 CMV-DNA 变为阴性。其中 10 例患者经更昔洛韦治疗 2 周后 CMV-DNA 转阴,4 例治疗 6 周后 CMV-DNA 转阴。无 CMV 感染死亡病例。

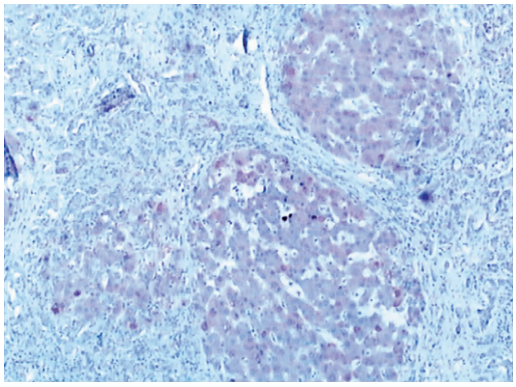


图 1 移植肝免疫组化染色,肝细胞 CMV 阳性表达呈棕黄色(SP ×400)

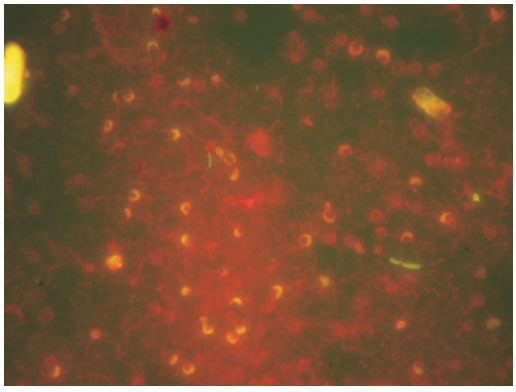


图 2 外周血 pp65 抗原免疫荧光染色,黄色为 CMV 阳性表达(×400)

3 讨论

器官移植患者接受免疫抑制剂治疗后,CMV 感染发生率可增加 1 倍[3],感染死亡率可达 25%,是肝移植术后患者死亡的重要原因之一,多发生于术后 2 ~ 6 个月。而 CMV 肺炎最为严重,其病程短,进展快,易合并细菌、真菌、原虫等混合感染。急性呼吸窘迫综合征(acute respiratory distress syndrome, ARDS)是导致 CMV 肺炎患者死亡的最直接原因,救治非常困难,一旦进展为 ARDS,其救治成功率仅有 10%[2]。因此,如何对肝移植术后肺部 CMV 感染进行有效地防治,已成为目前提高肝移植人、肝存活率的主要问题之一。

病原学检测和组织学检测是 CMV 感染诊断的必备条件。CMV-pp65 是在病毒复制早期出现的抗原,在抗原阳性的多形核细胞中含量丰富。与病毒分离比较,通过检测 CMV-pp65 抗原血症来判断体内有无活动性 CMV 感染的敏感性和特异性均在 95% 以上[4]。CMV 有着广泛的嗜细胞性,特别是血管内皮细胞、外周血白细胞等极易受到其侵袭。在活动性 CMV 感染时,外周血中的白细胞以主动或被动的方式从血管内皮细胞等获取大量的病毒抗原。因此只要能在外周血

中检出含有 CMV-pp65 抗原的白细胞,即可诊断为活动性 CMV 感染,而且敏感性和特异性高。CMV-pp65 阳性白细胞的数目还可以反映受者体内病毒的负荷,能体现 CMV 感染的严重程度、抗病毒治疗效果以及感染的预后[4]。一般用 2×10^5 个外周血白细胞中 CMV 阳性细胞数来定量,低、中和高水平的阳性细胞数分别为小于 5、5 ~ 50 和大于 50。CMV-pp65 检测的中等至高水平病毒血症发生 CMV 病的比例远远大于低水平病毒血症。可在出现症状前几天至 1 周得到阳性结果,利于早期诊断,提示其对 CMV 良好的诊断价值。根据 CMV 抗原血症水平可判断 CMV 感染的类型和时期,预测 CMV 肺炎的发生和预后,指导治疗。

PCR 用于检测临床多种标本中的 CMV-DNA,所要求的标本量很小,敏感性高,具有简便快速的特点。外周血中的白细胞或血浆、血清均可用于 CMV 的 PCR 检测。近年来的研究认为,血浆和血清更适合用于活动性 HCMV 感染的诊断,适合那些因白细胞过少难以行抗原血症检测的病人,而且血清或血浆能长期冻存,有利于回顾性诊断。用常规 PCR 检测 CMV-DNA,具有简便、快捷等特点。但是由于扩增后的产物需电泳检测,易造成交叉污染出现假阳性的结果。本研究应用实时定量 PCR(real-time quantitative PCR),同常规 PCR 相比,可以减少假阳性结果,同时可以较精确地进行定量分析[5]。但是,同 CMV-pp65 检测相比,仍有部分假阳性出现,说明 CMV 定量 PCR 的特异性较差。尽管如此,CMV 定量 PCR 较早的诊断 CMV 感染(中位提前 9.5 d),提高了检出率,可以弥补 CMV-pp65 诊断的不足。同时 CMV 定量 PCR 中等至高拷贝数发生 CMV 病的比例远远大于低拷贝数,亦较好地反映了 CMV 感染的严重程度。检测 CMV-DNA 有利于正确诊断 CMV 感染,还可预测 CMV 肺炎的发生和复发。组织活检的免疫组化检测是对活体组织的病理检测,病理诊断作为"金标准"准确性无庸置疑。但由于需组织穿刺,对病人具有一定的创伤。三种常用检测方法各有优势,综合使用更有利于临床诊断。

CMV 感染是器官移植后的一个严重并发症。一旦 CMV 感染则终生携带[6]。移植术后出现 CMV 感染的高峰时间约在 2 ~ 8 周,其临床表现多样,一部分病人没有临床症状,一些患者表现出 CMV 肺炎[7],出现肺间质的浸润,炎症。但移植后患者有时病情复杂,往往在病毒感染的同时合并有细菌感染。因此,在临床诊断上常有一定的困难。同样,CMV 肠炎和 CMV 肝炎亦存在诊断上的困难。因而,早期有效地诊断 CMV 感染对治疗是极其关键的。

CMV 感染的治疗目前首选药物是更昔洛韦,又名羟甲基无环鸟苷,是广谱抗病毒药物,对 CMV 有较好的抑制作用,其抑制 CMV 的作用是阿昔洛韦的 20 ~ 100 倍[8-9]。目前许多移植中心均采用有目标的预防性的使用更昔洛韦以减少移植术后的 CMV 感染。在进行了充分及时的抗 CMV 感染治疗后,绝大部分患者病毒血症转阴,症状消失。抗病毒治疗应充分、足疗程,不能因为病毒血症转阴而马上停止治疗。

综上所述,CMV 定量 PCR,CMV-pp65 抗原检测均能作为肝移植受者 CMV 感染早期诊断的有效手段,二者的检测结果基本一致。CMV 定量 PCR 更敏感,但存在一定的假阳性,CMV-pp65 抗原检测更特异,两者同时使用能更有效地提高诊断水平,监控疾病的发生发展;组织病理学作为诊断金标准毋庸置疑,但组织学穿刺具有微小创伤性。肝移植受者预防性使用更昔洛韦可减少术后发生 CMV 感染的风险。对于已知供体 CMV 阳性的患者,术后应尽早使用。

[参考文献]

[1] Singh N, Paterson DL, Gayowski T, et al. Cytomegalovirus antigenemia directed pre-emptive prophylaxis with oral versus I. V. ganciclovir for the prevention of cytomegalovirus disease in liver transplant recipients: a randomized, controlled trial[J]. Transplantation, 2000, 70(5): 717 - 722.

[2] 陈江华,茅幼英,何 强,等. 术前巨细胞病毒感染对移植肾急性排斥的影响[J]. 中华肾脏病杂志,2005,21(4):223 - 226.

[3] Jirasiritham S, Khunprakant R, Techawathanawanna N, et al. Treatment of simultaneous acute antibody-mediated rejection and acute cellular rejection with alemtuzumab in kidney transplantation: a case report[J]. Transplant Proc, 2010, 42(3): 987 - 989.

[4] 张 勇,吕 毅,谢占涛,等. 肝移植术后巨细胞病毒感染的诊断和治疗[J]. 西安交通大学学报(医学版),2009,30(6):687 - 688.

[5] Racusen LC, Colvin RB, Solez K, et al. Antibody-mediated rejection criteria - an addition to the Banff 97 classification of renal allograft rejection[J]. Am J Transplant, 2003, 3(6): 708 - 714.

[6] Winston DJ, Busuttil RW. Randomized controlled trial of sequential intravenous and oral ganciclovir versus prolonged intravenous ganciclovir for long-term prophylaxis of cytomegalovirus disease in high-risk cytomegalovirus-seronegative liver transplant recipients with cytomegalovirus-seropositive donors[J]. Transplantation, 2004, 77(2): 305 - 308.

[7] Halme L, Hockerstedt K, Lautenschlager I. Cytomegalovirus infection and development of biliary complications after liver transplantation[J]. Transplantation, 2003, 15, 75(11): 1853 - 1858.

[8] 韩 永,蔡 明,许晓光,等. 更昔洛韦对原位肝移植术后巨细胞病毒感染的预防和治疗:19 例临床资料回顾[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2007,11(51):10359 - 10361.

[9] Sureshkumar KK, Hussain SM, Carpenter BJ, et al. Antibody-mediated rejection following renal transplantation[J]. Expert Opin Pharmacother, 2007, 8(7): 913 - 921.

(编辑:余汇洋)