

[视频播报](#) / [新闻快讯](#) / [科研动态](#) / [专家讲坛](#) / [疑难病的讨论](#) / [临床验案](#)
 当前位置: [首页](#) >> [专家讲坛](#) >> 白细胞中巨细胞病毒抗原检测及在肾移植的临床应用

当前共有注册会员2713位, 30位在线

白细胞中巨细胞病毒抗原检测及在肾移植的临床应用

作者: 洪良庆 郑克立 朱兰英 吴培根 王晓波 文章来源: 2006-6-11 20:31:42 点击: 305次

关键词: 巨细胞病毒感染 抗原 病毒 肾移植

【摘要】 目的建立一种新的快速诊断巨细胞病毒(CMV)感染的方法并初步用于肾移植受者。方法 采用抗CMV抗原的单克隆抗体, 运用免疫组化链菌素-生物素标记法对外周血白细胞核中CMV抗原(即刻早期抗原和早期抗原)进行染色, 诊断CMV感染。结果共检测肾移植受者72例, CMV活动性感染率为47%(34/72), CMV发病率为18%(13/72)。CMV抗原阳性细胞数在CMV活动性感染者中平均为11.5/5万WBC, 在CMV病者为20.5±17.8/5万WBC。同时检测10名健康人, 结果均为阴性。结论该法具有快速、简便、成本低等优点, 且能达到定量检测的目的, 可用于临床对CMV感染的早期快速诊断。

of human cytomegalovirus antigen in periheral blood leukocytes hong Liangqing*, Zheng Keli, Zhu Lanying, et al. * Department of Urology, First affiliated Hospital, Zhongshan Medical University, Guangzhou 510080

【Abstract】 Objective to establish a new method for the diagnosis of human cytomegalovirus(HCMV) infection and disease in renal transplant recipients. Methods labeled streptavidin biotin (LSAB) method with CMV monoclonal antibody was used to detect CMV antigen in peripher, al blood leukocytes. Results CMV antigen positive cells were counted in every 5.0 ×10⁴ wbc. 72 renal transplant recipients were investigated. The rate of CMV active infection was 47% (34/72) and the average count of CMV antigen positive cells was 11.5/5.0 ×10⁴ WBC. The incidence of CMV disease was 18% (13/72) with a CMV antigen value of 20.5±17.8/5.0 ×10⁴ WBC. 10 healthy people were also studied and the results of CMV antigen were negative. Conclusions This method provides a rapid, accurate and low cost approach to the diagnosis of CMV infection and can be quantified easily.

【Key words】 cytomegalovirus infections Antigens, viral Kidney transplantation Labeled streptavidin biotin method

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)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(或称CMV综合征), 威胁患者的生命。在肾移植受者中, 由于免疫抑制剂的应用, CMV感染较为常见, 约占50%或以上, 其中10%~30%可发展成CMV病 [1], 导致移植肾功能丧失或患者死亡。因此, 对CMV感染进行早期、准确的诊断具有极其重要的意义。我们采

[在线专家](#)

::: 站内搜索 :::

全部内容

[论坛](#)[留言板](#)**明日在线专家****肾病防护**

- 健康长寿 贵在强肾
- 要充分重视继发性肾脏病的防
- 肾亏悄悄缠上年轻女性
- 慢性肾衰病人要补充钙吗?
- 肾病综合征饮食注意事项
- 肾病患者平时要清淡饮食

用免疫组化链菌素-生物素标记(labeled streptavidin biotin, LSAB)法对外周血白细胞中CMV抗原进行染色从而诊断CMV感染,并将该方法初步应用于临床,达到了早期、快速诊断的目的,现介绍如下。

对象与方法

一、研究对象

检测1996年2月~1997年3月在本院接受肾移植的受者72例,其中男52例,女20例,年龄26~65岁,平均42.5岁。所有受者术后均用环孢素A+强的松+硫唑嘌呤(CSA+pred+Aza)三联免疫抑制方案。

二、设备及试剂

普通光学显微镜; CMV单克隆抗体; LSAB试剂盒(购自丹麦DAKO公司,批号为K9002); Tris碱。

三、CMV抗原检测(LSAB法)

1. 标本收集和处理: 外周静脉血3~5 ml, EDTA抗凝,离心5分钟(500 r/min),吸取血浆层移入另一离心管。离心8~10分钟(1 000 r/min),弃去上清液,加0.83% nH4Cl数滴,冰水中作用5分钟,以溶解混杂的红细胞。加大量Tris-盐酸碱缓冲液(TBS)稀释,离心5分钟(600~800 r/min),弃去上清液,加适量TBS,普通光学显微镜下调整细胞浓度(含WBC 1.0×10^6 /ml)。

2. 细胞片制备: 微量吸管吸取上述白细胞悬液50 μ l(含WBC5万个),加玻片上,面积约2 cm \times 2 cm大小,干燥后用4 $^{\circ}$ C丙酮固定10分钟,每例标本涂片2张。

3. CMV抗原染色: 细胞片置0.3% H_2O_2 中10分钟(室温),以阻断内源性过氧化物酶反应,TBS洗片。滴加1:20倍稀释的正常猪血清阻断剂,阻断非特异性蛋白结合,37 $^{\circ}$ C作用30分钟,TBS洗片;滴加1:20倍用TBS稀释的抗CMV即刻早期蛋白和早期蛋白的单克隆抗体(一抗),37 $^{\circ}$ C孵育30分钟,TBS洗片。加1:400倍稀释的连接剂(二抗,为兔抗鼠IgG),37 $^{\circ}$ C30分钟,TBS洗片;加1:400倍稀释的链菌素(streptavidin),37 $^{\circ}$ C30分钟,TBS洗片。滴加新配制的3,3-二氨基联苯胺(DAB)溶液(含TBS 5 ml+DAB5 mg+3% H_2O_2 15 μ l)显色1~3分钟或光学显微镜下控制显色;苏木素液淡染1~2分钟,清水洗片。25倍物镜观察整张细胞片,计数阳性细胞个数。

4. 对照设立: (1)阳性对照: 用已知CMV病患者的细胞片作阳性对照。(2)阴性对照: 用tBS缓冲液代替一抗或不加一抗作阴性对照。

结果 一、染色结果

CMV抗原阳性细胞核呈黄色或棕黄,阴性细胞核呈蓝色。阳性结果以每张细胞片上(含5万WBC)阳性细胞总数(抗原指数)表示。

二、病例检测结果

72例中,抗原阳性者共34例(47%),阳性细胞数为2.0~64.0/5万WBC,平均11.5/5万WBC。其中10.0~30.0/5万WBC者16例(占47%),>30.0/5万WBC者5例(占15%)。

34例抗原阳性者中,有症状的CMV病者13例(38%),阳性细胞数5.0~64.0/5万WBC,平均 $20.5 \pm 17.8/5$ 万WBC,其中10.0~30.0/5万WBC者7例,>30.0/5万WBC者4例。

21例无症状抗原阳性者,阳性细胞数为2.0~42.0/5万WBC,平均 $8.0 \pm 9.9/5$ 万WBC。

应用本法检查10名血清学阴性的健康人,结果均为阴性。

讨论

1. 目前诊断CMV感染常用方法有抗体检查、病毒培养、聚合酶链反应(PCR)、病毒核酸杂交等,但都存在不足,难以满足临床需要。如抗体检查,由于用免疫抑制剂后,部分患者可无抗体反应或反应延迟而影响阳性率;病毒培养法繁琐,费时长(1周以上),并且易受细菌、霉菌等生长所污染,目前已很少应用;病毒核酸杂交技术难度较大且复杂,难以普及应用;而PCR检查也易受多因素影响,并且由于敏感度高可能检测出隐性感染者或出现假阳性。此外,上述方法均不能做到定量检测。基于上述因素,参照国外的实验[2]并作适当的改进(用LSAB法代替ABC法),我们对外周血白细胞中CMV抗原进行检测(LSAB法),避免了上述方法的不足,对CMV感染能做出快速的诊断。

2. CMV感染细胞后可在细胞核内表达即刻早期、早期和晚期蛋白(即病毒抗原)。即刻早期蛋白属磷酸

蛋白, 分子量为65 000, 通常在病毒感染细胞后3~4小时即开始合成, 并在以后的病毒基因表达中起着重要的作用; 早期蛋白在其后稍晚合成 [3]。两者均属病毒复制调控蛋白, 其存在提示病毒呈活动状态。

CMV抗原测定即是利用针对即刻早期蛋白的单克隆抗体, 运用免疫组化染色的方法对感染细胞核进行染色, 可以直接反映外周血中有无活动性CMV感染。而隐性感染者CMV潜伏无复制, 故无病毒蛋白表达, 抗原染色为阴性。本研究对10名健康人检查结果均为阴性。CMV抗原最早在感染后数小时即可检测出来, 可用于早期诊断。

3. 目前国外文献报道的CMV抗原检测通常采用ABC法或免疫荧光检测法 [2, 4]。ABC免疫组化法的缺点是常难避免内源性过氧化物酶的非特异性染色而致假阳性。我们采用LSAB免疫组化法的优点是过氧化物酶直接结合在链菌素分子上, 形成链菌素过氧化物酶复合物, 比ABC法中的卵白素-生物素-过氧化物酶复合物分子量小, 在组织中具有更强的穿透力; 其次是因为链菌素与生物素的化学亲和力比卵白素更强, 能与第二抗体更迅速牢固地结合, 因而敏感性大大增加, 且染色前我们用H202阻断内源性过氧化物酶, 用正常猪血清阻断剂阻断了非特异性蛋白结合而使假阳性率降低 [5]。LSAB法的另一优点是染色背景清晰, 染色时间(仅5~6小时)较ABC法(约8~12小时)大大缩短。免疫荧光法的缺点是需要荧光显微镜、且易受杂质污染而影响判断。LSAB法无需荧光显微镜, 普通显微镜即可。我们发现只要染色时间控制恰当, 均能得到满意的效果, 阴性细胞和阳性细胞具有明显区别, 易于判断。

4. 免疫组化法抗原检测还可以做到定量检测, 这对CMV感染的诊断和治疗具有重要的指导意义。CMV抗原指数是反映体内病毒数量(即病毒“负荷”)的较好指标, CMV病的发生与转归和体内病毒“负荷”有一定的相关性 [6]。抗原指数高或升高迅速, 常提示为CMV病, 低抗原指数或抗原指数稳定者多为无症状活动性感染。本组CMV病者中平均抗原指数为 $20.5 \pm 17.8/5$ 万WBC, 而无症状者为 $8.0 \pm 9.9/5$ 万WBC, 两组比较差异有显著性($P < .05$)。我们还发现, 随着CMV感染治疗的好转, 抗原指数也逐渐下降, 治疗无效者抗原指数变化不大或增高。此时可能为药物剂量不足或病毒耐药。本组13例CMV病者经治疗8例痊愈, 抗原指数均下降, 其中6例转阴; 而5例死亡者中2例抗原指数居高不下, 3例下降缓慢, 经调整药物剂量或更换药物后, 3例抗原指数下降, 后因其他并发症死亡, 2例无效。值得注意的是, CMV病不仅与病毒负荷相关, 还受其他因素如机体免疫水平、一般状况、及是否伴发其他感染或排斥等影响, 因此, 少数抗原指数高者可能并无临床症状, 而低抗原指数者也有可能出现明显的发热等临床表现, 如本组病例中有抗原指数为 $42.0/5$ 万WBC时仍无临床疾病表现者, 而有的则抗原指数仅为 $5.0/5$ 万WBC即有明显症状。因此, 仅靠CMV抗原指数诊断CMV病应慎重。本组结果表明, 抗原指数为 $10.0 \sim 30.0/5$ 万WBC者对CMV病的阳性预测值仅为43.8%(7/16), $>30.0/5$ 万WBC时阳性预测值是4/5。72例中有CMV病者13例, 抗原检测均阳性, 该法诊断CMV病敏感性为100%(13/13)。

CMV抗原检测方法需时较短, 一般仅需5~6小时, 无需昂贵设备, 在普通实验室即可开展, 且成本较低, 不失为一种快速、简便、准确而敏感性高的诊断CMV感染的方法, 目前国内尚未开展, 值得推广应用。

参考文献

- 1 Metselaar hJ, Weimar W. Cytomegalovirus infection and renal transplantation. J Antimicrob chemother, 1989, 23:37-47.
- 2 Van der Bij W, Torensma R, van Son WJ, et al. Rapid immuno-diagnosis of active cytomegalovirus infection by monoclonal antibody staining of blood leucocytes. J med Virol, 1988, 25:179-188.
- 3 The TH, van den Ploeg M, van den Berg AP, et al. Direct detection of cytomegalovirus in

peripheral blood leukocytes --a review of the antigenemia assay and polymerase chain

reaction.

transplantation, 1992, 54:193-198.


4 Egan JJ, Barber L, Lomax J, et al. Detection of human cytomegalovirus antigenaemia: a rapid diagnostic technique for predicting cytomegalovirus infection/pneumonitis in lung and heart transplant recipients. Thorax, 1995, 50:9-13.


5 吴惠茜, 林汉良, 宗永生. 免疫组织化学LSAB和ABC法敏感性比较. 中山医科大学学报, 1993, 14:117-119.


6 The TH, van den Berg AP, van Son WJ, et al. Monitoring for cytomegalovirus after organ transplantation: a clinical perspective. Transpl ant Proc, 1993, 25:5-9.


相关链接

[\[更多信息\]](#)


 [叶传蕙教授治疗慢性肾小球肾炎蛋白尿的经验](#)

 [刘玉宁-陈以平教授治疗肾病临床经验探讨之二
\(摘要\)](#)

 [邓跃毅-尿液蛋白质组学在肾脏病研究中的应用](#)

 [梁萌-抗生素在连续性血液净化中的运用](#)

 [方敬爱-结肠透析疗法](#)

 [谢院生-从发病机制探讨IgA 肾病的治疗](#)

专家评论

[\[查看专家评论\]](#)

用户名:

*

密码:

*

友情链接



[265上网导航](#)

[shen39论坛](#)

[中华医学会](#)

[中国中西医结合学会](#)

[中国胃病网](#)

[中国肾病康复](#)

[临床心电图](#)

[肾脏病分会](#)

登陆总数:

[网站简介](#) · [广告服务](#) · [招聘信息](#) · [网站律师](#) · [在线答疑](#) · [网站申明](#) · [联系我们](#)
中国中西医结合肾脏病网 版权所有 *本站信息仅供参考 不能作为诊断及医疗的依据*