

• 论 著 • DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2020.10.010

巨细胞病毒 UL97 基因突变类型的分析

罗妙玲¹,徐韞健^{2△},李秋霞³

1. 广东省广州市海珠区中医医院检验科,广东广州 510220;2. 广州医科大学附属第一医院检验科,广东广州 510120;3. 广州医科大学金域检验学院 2015 级,广东广州 528240

摘要:目的 通过基因测序分析巨细胞病毒(CMV)的 UL97 基因突变情况,指导临床用药。方法 回顾性分析 2018 年 6—12 月进行 CMV 检测的患者情况,分析 CMV 阳性率在不同标本的分布,并选取 CMV 拷贝数>1 000 copy/mL 的标本 30 例,进行 UL97 基因片段 PCR 扩增,对扩增产物进行测序,与 CMV 标准毒株 AD169 序列比对,参照国内外报道的耐药相关的热点突变,判定耐药基因突变类型。结果 痰标本 CMV 阳性率检出率最高,达 43.57%(210/482),器官移植后患者 CMV 阳性率最高,为 25.00%(22/88);序列分析发现 8 例移植患者标本发生了 UL97 基因氨基酸的替代,其中有 5 例为 3 个月持续在其血中发现高载量的 CMV。结论 CMV 感染患者 UL97 基因的检测有助于发现耐药突变,从而有效指导临床用药。

关键词:巨细胞病毒; 移植; 耐药基因; UL97

中图法分类号:R446.5

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2020)10-1348-04

Analysis on mutation types of cytomegalovirus UL97 gene

LUO Miaoling¹,XU Yunjian^{2△},LI Qiuxia³

1. Department of Clinical Laboratory, Haizhu District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou, Guangdong 510220, China; 2. Department of Clinical Laboratory, First Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 510120, China; 3. Grade 2015, Kingmed College of Laboratory Medicine, Guangzhou Medical University, Guangzhou, Guangdong 528240, China

Abstract: **Objective** To analyze cytomegalovirus (CMV) UL97 gene mutation situation by the gene sequencing for guiding clinical medication. **Methods** The CMV detection situation from June to December 2018 was retrospectively analyzed. The distribution of human CMV (HCMV) positive rates in different samples was analyzed. Thirty samples of CMV copy number >1 000 copy/mL were selected. The UL97 gene segment conducted the PCR amplification, The amplification products were sequenced and compared with AD169 sequence in CMV standard toxic strain AD169. Then the mutation type of drug resistant gene was judged by referring to drug resistance related hotspot mutation reported by domestic and abroad. **Results** The detection rate of CMV positive rate was the highest in sputum samples, reaching 43.57% (210/482), and the CMV positive rate was the highest in organ transplantation patients, reaching 25.00% (22/88). The sequence analysis revealed that amino acid substitution of the UL97 gene occurred in 8 transplant patients, among them, 5 cases of high load CMV were found in blood for persistent 3 months. **Conclusion** The UL97 gene detection in the patients with CMV infection can help to find drug-resistant mutations, thus effectively guide clinical medication.

Key words: cytomegalovirus; transplantation; drug resistance gene; UL97

巨细胞病毒(CMV)是人类疱疹病毒 5 型,也称细胞包涵体病毒,属于疱疹病毒组的 DNA 病毒。CMV 可通过呼吸道、上消化道或泌尿生殖道的上皮进入人体,引起以呼吸系统、消化系统、生殖泌尿系统以及中枢神经系统为主的各系统感染,患者临床表现从轻微无症状感染到严重缺陷或死亡。绝大多数感染者没有明显症状,但是在婴幼儿和免疫功能较差的机体中可引起严重疾病。普通人群感染 CMV 后一般没有症状或者症状轻微,但 CMV 肺炎是实体器官移植最常

见的感染性并发症。临床用于预防和治疗 CMV 感染的药物主要有更昔洛韦(GCV)、膦甲酸钠(FOS)、西多福韦(CDV)等,这些药物通过与 DNA 聚合酶竞争达到抑制病毒 DNA 复制的作用。由于 GCV 耐药的突变点经常存在一定的密码子中,80%~85% 的 UL97 基因突变发生在密码子 460、520 以及 590~607 的密码子中^[1]。在密码子 460(M460 V/L)、520(H520Q)和 591~607(A594V, L595S, C603W)中比较容易观察到碱基突变和氨基酸的替代现象^[2]。本

研究扩增 UL97 基因的密码子 400~630,对序列进行突变位点研究,现报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2018 年 6—12 月广州医科大学附属第一医院临床送检怀疑 CMV 感染的 3 629 例标本,其中男 2 334 例,女 1 295 例;包括血浆 2 648 例,痰 482 例,纤维支气管镜取痰 91 例,尿液 289 例,肺泡灌洗液 84 例,脑脊液 1 例,咽拭子 17 例,胸腔积液 4 例,羊水 12 例,乳汁 1 例。

1.2 试剂与仪器 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪和 ABI 9700 PCR 仪(美国赛默飞公司生产);凝胶成像分析系统(珠海黑马公司生产);人 CMV 核酸定量检测试剂盒(广州达安公司生产);核酸提取液(上海凯杰生物公司生产);PCR 扩增混合物(大连宝生物公司生产);引物(上海生工公司合成) UL97 F: 5'-GCT ACC GAC GTG CCT TTT GC-3' 658 bp,R: 5'-ACG CGA CAC GAG GAC ATC TTG-3'。

1.3 方法

1.3.1 标本筛选 分析 CMV 感染患者的情况,均具有明显的 CMV 肺炎现象,如不明原因的发热和咳嗽气促或呼吸困难,中性粒细胞数量减少,血小板数量减少,以及血清 CMV-DNA 阳性。此类患者的标本进行 DNA 提取后置于-20℃冰箱,使用 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪检测 CMV 的拷贝数,阳性结果判断标准参考试剂说明书:测定结果大于 500 copy/mL,除血浆以外的标本直接报告拷贝数,血浆标本测定结果应乘以 4。收集 CMV 拷贝数>10 000 copy/mL 的标本。

1.3.2 血浆标本提取 于离心管中加入 100 μL 待测标本和 100 μL DNA 提取液 1 充分混匀震荡,14 000 r/min 离心 10 min,离心后弃去上清液,加入 20 μL DNA 提取液 2,刮弹溶解沉淀,14 000 r/min 离心 30 s,置于 100℃干浴器中干浴 10 min,然后以 14 000 r/min 离心 10min,上清液用作 PCR 模板备用,放置-20℃保存。

1.3.3 痰、肺泡灌洗液提取 于待测标本中加入 3 倍体积 4%的 NaOH 溶液,震荡至液化后吸取 1 mL 标本于离心管中,14 000 r/min 离心 10 min,弃上清液后加入 1 mL 灭菌双蒸水,吹打混匀,14 000 r/min 离心 7 min,弃上清液加入 DNA 提取液 225 μL,震荡混匀。14 000 r/min 离心 30 s,置于 100℃干浴器中干浴 10 min 后,14 000 r/min 离心 10 min,上清液用作 PCR 模板备用,放置-20℃保存。

1.3.4 尿液、胸腔积液、脑脊液、羊水和乳汁标本提取 不需前处理,吸取 1 mL 标本于离心管中,提取步骤同痰标本。

1.3.5 PCR 扩增与测序 选择 CMV 拷贝数>10 000 copy/mL 的标本进行扩增。扩增体系为 25 μL,体系中含有 Taq 酶混合物 12.5 μL,双蒸水 8.5

μL,前向引物 1 μL,后向引物 1 μL,DNA 模板 2 μL。扩增条件:95℃5 min 加热裂解,95℃1 min,57℃45 s,72℃45 s,共 30 个循环,最后 72℃5 min。于 1%琼脂糖凝胶电泳检测扩增结果,送上海生工公司测序,扩增产物与 CMV 标准毒株 AD169 序列比对。

1.4 统计学处理 应用 SPSS22.0 软件进行数据分析,计数资料以百分率表示,组间比较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同标本中 CMV-DNA 检测结果比较 3 629 例 CMV-DNA 标本中,阳性标本 573 例,阳性率为 15.44%。其中血浆标本阳性率为 9.50%;痰标本阳性率最高,达 43.57%;痰标本阳性率明显高于其他标本,差异有统计学意义($P<0.05$)。CMV 拷贝数>10 000 copy/mL 的标本共 30 例,其中血浆 6 例,痰 10 例,纤维支气管镜取痰 3 例,尿液 9 例,肺泡灌洗液 2 例。见表 1。

2.2 CMV-DNA 阳性患者在不同病区的比较 573 例 CMV 阳性患者中,器官移植后患者感染 CMV 阳性率最高,为 25.00%,与呼吸科和血液科相比差异有统计学意义($P<0.05$)。见表 2。

表 1 不同标本中 CMV-DNA 检测结果比较

标本类型	总例数	阳性例数	阳性率(%)
血浆	2 648	252	9.52*
痰	482	210	43.57
纤维支气管镜取痰	91	28	30.77*
尿液	289	64	22.15*
肺泡灌洗液	84	18	21.43*
咽拭子	17	1	5.88*
胸腔积液	4	0	0.00
脑脊液	1	0	0.00
羊水	12	0	0.00
乳汁	1	0	0.00
总计	3 629	573	15.79

注:与痰比较,* $P<0.05$ 。

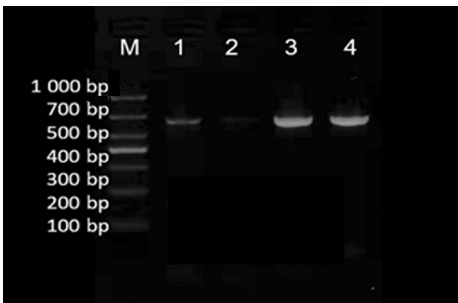
表 2 CMV-DNA 阳性患者在不同病区的比较

病区	总例数	CMV 阳性例数	CMV 阳性率(%)
器官移植	88	22	25.00
重症监护室	806	181	22.46
儿科	216	46	21.30
呼吸科	1 422	211	14.84*
血液科	571	47	8.23*

注:与器官移植比较,* $P<0.05$ 。

2.3 电泳结果 经 PCR 扩增 UL97 基因,电泳后可见一长度为 638 bp 的 DNA 条带,与预期产物大小相符。见图 1。

2.4 UL97 基因测序结果分析 测序结果与 CMV 标准株 AD169 序列进行对比发现,8 例标本 UL97 基因发生了碱基的突变,均为器官移植患者标本,其中有 5 例为 3 个月持续在其血中发现高载量的 CMV。无义突变包括 1362 C→T、1368 T→C、1575 C→T、1657 T→C、1698 G→A、1737 T→C、1896 C→T、1902 A→G,这些突变并未导致相应氨基酸的改变;1815 C→G、1525 C→T、1781 G→T 这 3 处碱基突变,导致相应氨基酸 D605E、P509S、A594V 的改变。见表 3。



注:M 为 Marker;1、3、4 为标本扩增条带;2 为阴性对照。
图 1 UL97 基因扩增产物电泳结果

表 3 8 例患者 UL97 基因突变分析

编号	性别	氨基酸突变	碱基变化	病毒载量 (copy/mL)
1	女	D605E	1815 C→G,1368 T→C,1575 C→T,1657 T→C,1737 T→C,1902 A→G	10 300
2	男	D605E	1815 C→G,1362 C→T,1368 T→C,1657 T→C,1737 T→C,1902 A→G	30 500
3	男	P509S	1525 C→T,1362 C→T,1368 T→C,1582 G→T,1657 T→C,1737 T→C,1896 C→T,1902 A→G	14 700
4	男	A594V,D605E	1781 G→T,1815 C→G,1368 T→C,1657 T→C,1698 G→A,1737 T→C,1902 A→G	22 600
5	男	D605E	1815 C→G,1368 T→C,1657 T→C,1698 G→A,1737 T→C,1902 A→G	15 500
6	男	D605E	1815 C→G,1368 T→C,1896 C→T	25 000
7	男	D605E	1815 C→G,1657 T→C,1698 G→A,1902 A→G	14 500
8	女	D605E	1815 C→G,1657 T→C,1698 G→A,1902 A→G	15 900

3 讨 论

CMV 基因转录是病毒复制活跃的标志物,在临床上 CMV 早期和晚期基因转录物 mRNA 的检测通常用作 CMV 活性感染诊断的指标。PCR 用于 CMV 感染的检测,具有灵敏度高,特异性强,检测方法简便、快捷等特点,可作为 CMV 感染的早期诊断指标。动态监测 CMV 感染,可及时反映病毒载量,预测感染严重程度,在 CMV 感染诊断中有很好的实用价值。近年来 CMV 肺炎的发病率有上升的趋势,加之标本大部分来源于呼吸道感染患者,因此本研究中痰标本检测阳性率最高。另外,尿液和肺泡灌洗液标本阳性率均高于血浆标本,与有关报道^[3]相符。

BARADHI 等^[4]研究发现 CMV 耐药现象在高病毒载量中更易存在,因此,本研究选取的 30 例标本的病毒拷贝数在 10 000 copy/mL 以上。由于移植后患者需要应用大剂量的免疫抑制剂,因此 CMV 感染和耐药情况在实体器官移植手术后发病率远远高于健康人,CMV 感染与移植死亡率升高明显相关。实体器官移植术后 CMV 感染因不同移植器官类型而不同,在肺移植发生率最高,之后为心脏移植和肝移植^[5]。GCV 耐药表现在临床上比较常见,当药物的临床治疗效果降低或病毒对药物应答反应较差时应怀疑为耐药。当患者正在接受足量 GCV 抗病毒治疗,病毒载量不下降甚至持续增加超过 2 周时应考虑 GCV 耐药。

MEESING 等^[6]发现 CMV 耐药发生率与免疫抑制剂的强度有关,抗淋巴细胞球蛋白类制剂如抗胸腺球蛋白或抗 CD3 单克隆抗体的使用,使 CMV 感染的风险增加 3~4 倍。本研究中 A594V 突变是在 1 例心肺联合移植的患者中发现的,这例患者术后联合使用抗胸腺球蛋白与抗病毒药物。当患者体内检测出 CMV 复制后,由于患者伴有不明原因的发热和咳嗽气促,白细胞数量减少,血小板数量减少等疑似 CMV 肺炎的症状,所以临床用药改为 GCV 静脉滴注,给予足量 GCV 治疗,但 CMV 病毒载量未下降,反而由原来的 10 500 copy/mL 上升至 22 600 copy/mL,该现象也符合 GCV 耐药现象。此例患者伴有 D605E 的改变,既往多数人研究认为 D605E 存在属于基因多态性改变,无论是单一突变还是联合突变,其未赋予 GCV 敏感性的任何变化^[7]。但最近也有研究认为,如果同时发生 A594P/D605E 或 M460V/D605E 联合突变,则亦可导致对 GCV 耐药^[8]。CHOU 等^[9]研究发现 A594V 突变会使 GCV 的最大抑制浓度增加 6~9 倍,但这种情况并未在上述心肺联合移植的患者中出现。本研究中有 7 例患者均发生了 D605E 的变化,这种氨基酸的替代最常见,ZHANG 等^[10]发现 D605E 突变的检出率在肾移植患者中高达 42.9%。本研究还发现一种国内外鲜见报道的 P509S 突变,此例患者并未出现临床 GCV 耐药情况,其突变与 GCV 耐药可能没有直接作用。

(下转第 1354 页)

HBsAg 初筛后阳性率有了明显下降,在此期间曾出现一批乙肝试纸条因检测结果不达标而退回厂家,说明每批试剂开展进货检验是有必要的。

按照进货检验要求^[4-5],对于血源筛查的体外诊断试剂盒,必须要有国家食品药品监督管理部门批签发报告,其他检测试剂,以生产厂商出具的出厂检验报告为准。当需要留取 HBsAg 阳性标本时,建议选择 S/CO 值在 28.00±2.00 的阳性标本作为验证使用,阳性标本必须经过消毒灭活后装管冷冻保存,尽量降低检测人员职业暴露的风险。水平为 4 IU/mL 的 HBsAg 标准物质和 S/CO 在 28.00±2.00 的 HBsAg 阳性标本均能够作为乙肝试纸条进货性能验证使用。而使用 4 IU/mL 的 HBsAg 标准物质既没有职业暴露风险,又解决了 HBsAg 阳性标本在低温存储环境下反复冻融导致抗原活性下降的问题,是乙肝试纸条进货性能验证的最佳选择。

参考文献

[1] 史殿魁,魏明. 乙肝表面抗原检测中 ELISA 法和胶体金试纸条法应用分析[J]. 当代医学,2018,24(5):129-130.
[2] BARAZANI Y, HIATT J R, TONG M J, et al. Chronic viral hepatitis and hepatocellular carcinoma[J]. World J Surg,2007,31(6):1245-1250.
[3] DREIER J, KROGER M, DIEKMANN J, et al. Low-level

viraemia of hepatitis B virus in an antiHBc antiHBs positive blood donor[J]. Transfus Med,2004,14(2):97-103.
[4] 中华人民共和国国家卫生健康委员会. 血站技术操作规程;国卫医函[2019]98 号附件[S]. 2019 版. 北京:中华人民共和国国家卫生健康委员会,2019:54.
[5] 中国合格评定国家认可委员会. CNAS-CL39 医学实验室质量和能力认可准则在临床免疫学定性检验领域的应用说明[S]. 北京:中国合格评定国家认可委员会,2012.
[6] 周玲,吕定. 金标法检测乙肝表面抗原漏检原因分析[J]. 检验医学与临床,2014,11(17):2402-2403.
[7] 程颖,李维,田耘博,等. 无偿献血者乙肝表面抗原弱阳性标本不同检测方法结果比较[J]. 检验医学与临床,2015,12(16):2444-2446.
[8] 陈臣,张燕琳,裘晓阳. 乙肝表面抗原胶体金检测试剂卡性能验证研究[J]. 预防医学情报杂志,2018,34(6):759-762.
[9] TAKEDA K, MARUKI M, YAMAGAITO T, et al. Highly sensitive detection of hepatitis B virus surface antigen by use of a semiautomated immune complex transfer chemiluminescence enzyme immunoassay [J]. J Clin Microbiol,2013,51(7):2238-2244.
[10] 张毓,孙国栋,徐晓艳,等. ELISA 法不同 S/CO 值与金标法检测无偿献血者 HBsAg 相关性研究[J]. 临床输血与检验,2016,18(6):559-561.

(收稿日期:2019-08-23 修回日期:2020-03-03)

(上接第 1350 页)

参考文献

[1] SOHRABI M, BEHZADIAN F, HOSSEINI S M, et al. Molecular analysis of ganciclovir-resistant cytomegalovirus in renal transplant recipients with high viral load[J]. Arch Iran Med,2016,19(10):700-703.
[2] 夏长胜,张正. 人巨细胞病毒耐药突变及其检测的研究进展[J]. 中国实验诊断学,2010,14(5):776-780.
[3] 张美娜,赵虎,李仁哲,等. 新生儿巨细胞病毒感染的临床检测研究[J]. 检验医学与临床,2018,15(18):2812-2813.
[4] BARADHI K M, AURE R L, EL-AMM J M. High-dose valganciclovir treatment for resistant cytomegalovirus colitis due to UL97 and UL54 mutations [J]. Transplant Proc,2018,50(1):142-144.
[5] 曾爱红,董德坤,崔喜梅,等. 造血干细胞移植后巨细胞病毒药敏检测及 UL97 基因突变分析[J]. 南方医科大学学报,2014,34(4):519-522.
[6] MEESING A, RAZONABLE R R. Pharmacologic and immunologic management of cytomegalovirus infection after solid organ and hematopoietic stem cell transplantation [J]. Expert Rev Clin Pharmacol,2018,11(8):773-788.

[7] MONFORTE V, SINTES H, LOPEZ-GALLO C, et al. Risk factors, survival, and impact of prophylaxis length in cytomegalovirus-seropositive lung transplant recipients: a prospective, observational, multicenter study [J/OL]. Transpl Infect Dis, 2017, 19(3) [2019-10-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28294487>.
[8] BEAM E, GERMER J J, LAHR B, et al. Cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in bronchoalveolar lavage fluid of immunocompromised patients with CMV pneumonia [J/OL]. Clin Transplant, 2018, 32(1) [2019-10-04]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/291122781>.
[9] CHOU S W, ERCOLANI R J, VANARS DALL A L. Differentiated levels of ganciclovir resistance conferred by mutations at codons 591 to 603 of the cytomegalovirus UL97 kinase gene[J]. J Clin Microbol,2017,55(7):2098-2104.
[10] ZHANG Y, ZHAO Z, SUN J B, et al. A new mutation in the human cytomegalovirus UL97 gene may confer ganciclovir resistance in Chinese kidney transplant recipient [J]. Arch Virol,2013,58(1):247-250.

(收稿日期:2019-10-07 修回日期:2020-03-05)