

拷贝数变异测序与 Q-PCR 检测巨细胞病毒感染一致性的比较

苏慧^{1#} 潘亮颖^{1#} 何桂林¹ 陈泽俊¹ 陈甦¹ 陈月芬¹ 王瑞霞¹ 朱薪¹ 凌奕^{2*} 刘春桃^{2*}

(1. 海南医学院, 海南 海口, 571199; 2. 海南医学院第一附属医院 胎儿医学科, 海南 海口, 570102)

【摘要】 目的 比较拷贝数变异测序(CNV-seq)与 Q-PCR 在测定先天性巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染方面是否存在一致性。方法 选取自 2020 年至 2022 年以来在海南省海南医学院第一附属医院产前诊断中心就诊过的 9 位患者的羊水进行两种检测技术的对比检测, 合并患者的临床资料, 进行总结。结果 CNV-seq 与 Q-PCR 均提示 1 例患者 CMV 感染阳性, 且为同一例; 8 例检测样本 CNV-seq 和 Q-PCR 结果显示均为阴性, 表明其妊娠异常可能并非感染 CMV 导致, 且检测结果呈现阴性并不能完全排除感染 CMV。结论 CNV-seq 与 Q-PCR 在测定先天性 CMV 感染方面可能存在一致性。

【关键词】 拷贝数变异测序; 定量聚合酶链式反应; 巨细胞病毒感染; 一致性

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Comparison of consistency between copy number variant sequencing and Q-PCR for cytomegalovirus infection

Su Hui^{1#}, Pan Liangying^{1#}, He Guilin¹, Chen Zejun¹, Chen Su¹, Chen Yuefen¹, Wang Ruixia¹, Zhu Xin¹, Ling Yi^{2*}, Liu Chuntao^{2*}

(1. Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 571199; 2. Department of Fetal Medicine, the First Affiliated Hospital of Hainan Medical University, Haikou, Hainan, 570102)

【Abstract】 **Objective** To compare the agreement between copy number variant sequencing (CNV-seq) and quantitative polymerase chain reaction (Q-PCR) in the determination of congenital cytomegalovirus (CMV) infection. **Methods** The amniotic fluid of nine patients who have visited the Prenatal testing center since 2020 to 2022 was selected for comparative detection of the two detection technologies, and the clinical data of the patients were summarized. **Results** CNV-seq and Q-PCR indicated that one patient was positive for CMV infection and the same case; 8 test samples CNV-seq and Q-PCR were negative, indicating that the pregnancy abnormality may not have been caused by CMV infection, and the negative test result does not completely rule out CMV infection. **Conclusion** There may be consistency between CNV-seq and Q-PCR in determining congenital CMV infection.

【Key words】 copy number variation sequencing (CNV-seq); quantitative polymerase chain reaction; cytomegalovirus infection; consistency

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染越

来越受到人们的广泛关注和重视。CMV 是目前全球最常见、危害最大且不容易被重视的新生儿先天性感染的病原体, 同时也是造成新生儿中枢神经性耳聋和神经发育迟缓的主要原因之一。全球新生儿先天性 CMV 感染的流行率总体为 0.2%~2%。新

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2023.04.007

基金项目: 2021 年大学生创新课题(X202111810009); 海南省卫生健康行业科研项目(22A200242)

* 通信作者: 凌奕, Email: dianalingyi@163.com; 刘春桃, Email: 1125284463@qq.com。# 共同第一作者。

生儿发生先天性 CMV 感染后,大约有 15%~20% 的孩子将会出现永久性的生理缺陷,给他们的家人和社会带来了较大的疾病负担^[1]。定量 PCR(Q-PCR)是目前 CMV 病毒血症首选的诊断技术,但其方法存在试剂敏感性以及特异性的问题。而拷贝数变异测序(CNV-seq)可以直接检测送检样本的 DNA 片段,无需考虑敏感性和特异性的问题,是现阶段临床上用于检测 CMV 的新方法。本文主要目的是比较拷贝数变异测序与 Q-PCR 在测定先天性巨细胞病毒(CMV)感染方面是否存在一致性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2020 年 6 月至 2022 年 6 月在海南省海南医学院第一附属医院产前诊断中心就诊的患者 9 例,见表 1,纳入标准^[2]:①超声提示胎儿发育异常;②具有羊水穿刺指征;③资料信息详尽者。本研究通过医院的科研伦理审查,批件号为 HYLL-2021-248。

表 1 样本数据及其临床表现症状

患者编号	年龄(岁)	临床表现
01	32	胎儿水肿
02	30	胎儿持续性右脐静脉
03	34	胎儿颅脑及面部异常声像,考虑无叶全前脑畸形
04	41	胎儿左肾缺如
05	35	高龄,胎儿双手多指畸形
06	29	NT 增厚
07	36	曾有一胎脊柱裂畸形
08	28	胎儿 NT 增厚 3.4mm
09	31	胎儿右锁骨下动脉迷走

1.2 仪器试剂 ①仪器:荧光定量 PCR 仪(厂商名:美国 ABI 公司。型号:7500);②试剂:人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒(购自圣湘生物科技股份有限公司)、MagPure Blood & DNA Kit 试剂盒(购自 Magen 公司)、人巨细胞病毒核酸检测试剂盒(购自之江生物股份有限公司)。

1.3 方法 前瞻性收集患者的临床资料和羊水样本。临床资料包括其影像学检查结果和实验室检查结果;将收集好的羊水样本送往海南主健细胞分子遗传医学检验中心进行 Q-PCR 对 CMV 感染的检测,记录检测结果,收集实验数据。本次研究所有实

验均外包完成。

1.3.1 Q-PCR 检验 ①样本准备:取羊水 1ml 于 1.5ml 的无菌离心管中,离心取沉淀即为标本;标本 12000rpm 离心 5min,沉淀加 50 μ l 的 DNA 提取液打匀;10 $^{\circ}$ C 保温 10min;12000rpm 离心 5min,取上清液,核对样本编号;将提取的样本置于-20 $^{\circ}$ C 保存备用。②参考品稀释和处理:将阳性定量参考品(2×10^8 copies/ml)6000rpm 离心数秒,标示数为 10^8 ;另取 4 支灭菌新 0.5ml 离心管,分别加入 90 μ l 稀释液,依次标数 $10^7 \sim 10^4$;吸取 10^8 管 10 μ l 至 10^7 管,用加样器反复混匀后换新吸头取 10 μ l 至 10^6 管,依此方法依次稀释至 10^4 管;吸取 5 个($2 \times 10^8 \sim 2 \times 10^4$ copies/ml)的阳性定量参考品梯度和阴性质控品各 40 μ l,分别加 40 μ l DNA 提取液打匀,以下步骤同样本处理,上清液待用于 PCR 扩增。③PCR 扩增:取 HCMV-PCR 反应管若干,分别加入处理后上清液各 2 μ l,6000rpm 离心 1min;将各反应管放入定量 PCR 仪器的样品槽内,按对应顺序设置阴性质控品、阳性定量质控参考品梯度(设置为 $10^8 \sim 10^4$ copies/ml)以及未知标本,并设置样品名称、标记荧光基因种类;循环条件:预变性(94 $^{\circ}$ C, 5min),然后按变性(94 $^{\circ}$ C, 15s)、退火及延伸和荧光采集(57 $^{\circ}$ C, 30s)进行 45 个循环^[3]。

表 2 引物序列表

靶向基因	引物序列
HCMV	5'.....CCA AGC GGC CTC TGA TAA CCA AG.....3'
mRNA	3'.....CAG CAC CAT CCT CCT CTT CCT CT.....5'

1.3.2 CNV-seq 检验 使用 Magen 公司 MagPure Blood & DNA Kit 试剂盒进行 DNA 提取。将 50 ng 基因组 DNA 酶切打断为 200~300 bp 小片段,经片段分选后进行末端修复。使用 T4 连接酶连接测序接头,并进行 7 个周期的 pre-PCR 反应。PCR 产物经磁珠纯化后,使用 Qubit dsDNA HS Assay 试剂盒测定文库浓度。将文库使用 MGISEQ-2000 测序仪,进行单端 50 bp 测序。下机数据质控标准为:①unique reads > 20 M;②GC 含量 38% ~ 44%;③重复率 $\leq 10\%$;④比对率 > 95%。测序数据生物信息学分析使用文献^[4]中报道的方法进行。具体地,唯一比对序列(使用

GRCh37/hg19 参考基因组) 被划分为连续滑动的窗口, 长度为 50 kb。计算每个窗口的覆盖度, 经 GC 含量校正后使用背景人群信息标准化。通过计算每条染色体的平均拷贝率检测染色体非整倍体, 通过计算拷贝率与正常拷贝率差异计算嵌合水平。CNV 区域拷贝比阈值设置为 > 1.1 或 < 0.9 。根据美国医学遗传学会 (American College of Medical Genetics, ACMG) 关于 CNVs^[5] 的解读指南, 对发现的 CNVs 开展致病性评估。变异分为致病变异、可能致病变异、意义不确定的变异、可能良性变异和良性变异。本研究仅反馈致病和可能致病性变异结果。病原体检测生物信息学分析前排除人源测序数据。测序数据使用 KneadData (数据库版本 hg37dec_v0.1) 处理, 并排除人源的序列。使用两种宏基因组学工具, 即 Metaphlan2^[6] 和 Kraken^[7], 构建病原体检测的生物信息学流程。Metaphlan2 利用一个独特的物种特异性标记 (markers) 的数据库来检测物种, 首先使用 bowtie2 将非人源数据映射到它的数据库 (版本 mpa_v30_CHOCOPhlAn_201901), 然后使用 metaphlan 命令进行相对丰度计算。Kraken 采用 k-mers 精确比对进行分类, 在标准 Kraken 数据库 (包含古菌、细菌、病毒、真菌、植物和人类 6 个子数据库) 中引入了原生动物种数据库, 构建了一个包含 35 bp、100 bp 和 150 bp 长度的 k-mers 的定制 Kraken 数据库。通过 braken 命令计算各物种的丰度。选择 Metaphlan2 与 Kraken 检出重叠的物种进行进一步分析, 以排除假阳性结果。对检出阳性的 CMV 病原体进行核酸检测。CMV 核酸检测使用之江生物试剂盒, 按照试剂盒说明书进行验证。

2 结果

本次共选取 9 例患者羊水, 运用 CNV-seq 和 Q-PCR 检测其羊水中是否感染 CMV, 其中一例患者两种检测方法下均为 CMV 感染阳性, 其余 8 例患者的 CMV 感染结果皆为阴性。其中, 01 号胎儿水肿, 有 3 次流产病史而送检, 未检测出非整倍体变异、符合性染色体连锁遗传及常染色体显性遗传方式的疾病, 疑似致病变异和目标区域单亲二倍体变

异; 检测出巨细胞病毒载量为 439382.28 拷贝/ml; 同时检测出 2p25.3p25.3 区域长约 542.43kb 的重复及 10p13p13 区域重复, 长约 135.53kb。03 号由于胎儿颅脑及面部异常声像, 考虑无叶全前脑畸形送检, 检出 13 号染色体重复 (13p13q34 区域, 长约 115.17Mb) 及 11q24.3q24.3 区域约 142.87kb 的重复 (拷贝数: 3), 其中 13p13q34 区域重复与 13 三体综合征有关, 11q24.3q24.3 区域为临床意义未明变异。05 号由于高龄, 胎儿双手多指畸形送检, 检出 16q24.1q24.1 区域约 143.17kb 的拷贝数杂合缺失 (拷贝数: 1) 为临床意义未明变异, 未检出非整倍体或符合性染色体连锁遗传及常染色体显性遗传方式的致病、疑似致病变异。06 号由于诊断 NT 增厚送检, 检出 1q41q41 区域约 141.82kb 的重复 (拷贝数: 3) 及 8q11.23q11.23 区域约 281.69kb 的重复 (拷贝数: 3) 均为临床意义未明变异, 未检出非整倍体或符合性染色体连锁遗传及常染色体显性遗传方式的致病、疑似致病变异。08 号由于胎儿 NT 增厚 3.4mm, 宫外孕一次, 停育一次送检检出 14q31.1q31.1 区域约 148.77kb 的缺失 (拷贝数: 1), 为临床意义未明变异, 未检出非整倍体或符合性染色体连锁遗传及常染色体显性遗传方式的致病、疑似致病变异。09 号由于胎儿右锁骨下动脉迷走送检, 检出 3p21.1p21.1 区域约 461.14Kb 的重复 (拷贝数: 3) 及 16p11.2p11.2 区域约 1.86Mb 的缺失 (拷贝数: 1), 均为临床意义未明变异, 未检出非整倍体或符合性染色体连锁遗传及常染色体显性遗传方式的致病、疑似致病变异。02、04、07 号 CNV-seq 检测均未检出非整倍体或符合性染色体连锁遗传及常染色体显性遗传方式的致病、疑似致病变异, 也未检出临床意义未明的 100kb 以上的微缺失或微重复变异。

本次采样对象共 9 名, 其中有 1 名患者 CMV 感染为阳性, 且其 CNV-seq 检测结果与 PCR 检测结果一致 (见表 3)。

3 讨论

CMV 属于疱疹病毒科和乙组疱疹亚科, 是胎儿宫内感染的常见病原体之一, 可以通过母婴垂直传播, 引起胎儿宫内感染, 是造成胎儿先天畸形、流

产、早产、生长受限甚至死胎,以及出生后神经、肝、脾、肾等多器官功能障碍的重要原因之一^[8]。发达

国家将其列为导致先天性感染最高级别的病毒^[9]。

表3 羊水样本 CNV-seq 及 Q-PCR 技术检测 CMV 结果比较

编号	CNV-Seq 结果			MV-DNA 的 Q-PCR 结果	
	CMV-DNA	染色体非整倍体	100Kb 以上缺失		
1	阳性	未检出	未检出	2p25.3p25.3、10p13p13	阳性
2	阴性	未检出	未检出	未检出	阴性
3	阴性	13号染色体	未检出	13p13q34、11q24.3q24.3	阴性
4	阴性	未检出	未检出	未检出	阴性
5	阴性	未检出	16q24.1q24.1	未检出	阴性
6	阴性	未检出	未检出	1q41q41、8q11.23q11.23	阴性
7	阴性	未检出	未检出	未检出	阴性
8	阴性	未检出	14q31.1q31.1	未检出	阴性
9	阴性	未检出	16p11.2p11.2	3p21.1p21.1	阴性

研究表明根据研究人群及选择的样本不同,主要采用免疫学和分子生物学方法对 CMV 进行血清学抗体和 DNA 检测来进行筛查和诊断,尤其是 CMV-IgM 抗体作为病毒近期感染的标志被广泛应用于人群流行病学调查和感染的临床辅助诊断^[10-11]。孕妇血清学检测是目前巨细胞病毒感染筛查的首选方法,血液、尿液、宫颈分泌物等标本的巨细胞病毒 DNA 检测(PCR 法)常用于感染的诊断^[12]。IgG 和 IgM 抗体同时阳性时,IgG 抗体亲和力检测结果可辅助临床判断是否为近期原发感染。巨细胞病毒特异性 IgG 抗体研究显示,如 IgG 抗体检测表现为高亲和力,则可排除近 18~20 周内的原发感染^[13-14],IgM 阳性和 IgG 低亲和力表示原发感染发生在近 3 个月,敏感度和特异度均大于 90%^[15-16]。在孕龄 2 周前取孕妇外周血或尿液运用 Q-PCR 检测其内的 CMV-DNA,若检出有 CMV 的 DNA 片段,即可诊断为孕妇宫内 CMV 感染^[17]。

CNV-seq 检测可对样本中的每一段基因进行测序,不依赖对病原体的预测和假设,几乎可以检测样本中所有的 DNA 或 RNA 序列,可对病原体的感染类型进行无偏倚筛查^[18]。基因组变异是较大的基因组 DNA 片段(≥ 1 kb),在个体之间具有可变的拷贝数,人类基因组的很大一部分是拷贝数可变的。包含基因的 CNV 可能会改变基因剂量、破坏基因或扰乱它们的表达水平,并且已知会导致许多疾病^[19]。如本次的病例 03 号,通过检测可以详细的定位有变化的基因片段,而此改变的片段也提示

出了可能出现的具体疾病。

CNV-seq 检测的方法还可以避开传统方法(培养法、血清法和 PCR 法)的局限性,若测序达到一定的通量可更准确地反映病原体生存的真实状态。快速地检测出已知病原体,还可以发现许多未知病原体^[20]。遗传变异的范围从单核苷酸变异(SNP)到大的染色体病(非整倍性)。在此范围内,缺失、插入和重复的长度超过 1 kb(使用深度覆盖下一代测序时有时为 500 bp)的核苷酸片段被称为拷贝数变异(CNV)^[21]。通过中等密度单核苷酸多态性评估患者样本中的 CNV 阵列和低覆盖度大规模并行 CNV-seq 测序,配对测序用于确认选定的 CNV 缺失断点^[22]。本次送检的 9 个羊水样本不但 CNV-seq 检测结果与 Q-PCR 结果一致,并且其中还发现 5 个出现了临床意义未明的变异(见表 3)。

研究表明孕妇的外周血液中也存在着胎儿部分的游离 DNA 片段,这些游离的 DNA 片段普遍较短,但是其绝对含量会随着孕周的增长而逐渐增加,分娩后母体内属于胎儿的部分 DNA 片段迅速消失。而在孕妇外周血胎儿 DNA 片段绝对含量较高的时候,则为无创获取胎儿遗传信息提供了很大的可操作性^[23]。CNV-seq 作为一种高通量、高分辨率、无需培养的先进技术,可以为无创获取胎儿遗传信息进行产前诊断提供更多的可尝试机会。本实验中因受检孕妇已经有羊水穿刺指征,且在本人认同及同意后行羊水穿刺对胎儿遗传信息的检测,但并不代表 CNV-seq 对胎儿遗传信息的检测样本只能

局限于羊水,其他含有胎儿遗传信息片段的样本,依靠染色体捕获等获取 DNA 的技术,均有无创进行 CNV-seq 检测的可能性。

综上所述,随着检测技术的发展,拷贝数变异测序的优越性越来越突出,不但与 Q-PCR 的检测结果一致并且检测更具有精确性,能检测到基因层面的变异。综合上述研究结果,我们认为 CNV-seq 可能对 CMV 感染的临床诊断具有一定的应用价值,同时可为 CMV 感染的一站式产前诊断平台的构建提供相应的临床依据;但后续需继续扩大样本量,同时亦需要在多个产前诊断中心开展前瞻性随机对照研究,为妊娠期巨细胞病毒感染的诊断提供依据,更好地应用于产前诊断领域。

参 考 文 献

- [1] 喻欢,黄悦,卫飞雪,等. 新生儿先天性巨细胞病毒感染的研究进展[J]. 中国妇幼保健,2018,33(14):3345-3349.
- [2] 张晓,李伟,屠荣良,等. 婴幼儿巨细胞病毒感染的临床特点及其影响分析[J]. 中国现代医生,2017,55(14):53-56.
- [3] 张缤月. 酶联免疫吸附法和实时荧光定量 PCR 法检验 EB 病毒的效果比较[J]. 中国实验诊断学,2022,26(7):1078-1081.
- [4] DAN S, CHEN F, CHOY KW, et al. Prenatal detection of aneuploidy and imbalanced chromosomal arrangements by massively parallel sequencing[J]. PLoS ONE, 2012, 7(2): e27835.
- [5] RIGGS ER, ANDERSEN EF, CHERRY AM, et al. Technical standards for the interpretation and reporting of constitutional copy-number variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics (ACMG) and the Clinical Genome Resource (ClinGen)[J]. Genet Med, 2020, 22(2): 245-257.
- [6] TRUONG DT, FRANZOSA EA, TICKLE TL, et al. MetaPhlan2 for enhanced metagenomic taxonomic profiling [J]. Nature Methods, 2015, 12(10): 902-903.
- [7] WOOD DE, SALZBERG SL, KRAKEN. Ultrafast metagenomic sequence classification using exact alignments [J]. Genome Biology, 2014, 15(3): 1-12.
- [8] 郭丹华,何德钦,何淑琼,等. 胎儿先天性巨细胞病毒感染超声筛查与临床分析[J]. 中华围产医学杂志, 2018, 21(8): 519-524.
- [9] Centres for Disease Control and Prevention. Preventing Congenital CMV Infection[EB/OL]. <http://www.cdc.gov/cmvp/prevention.html>, 2012-08-18/2018-11-02.
- [10] 王敬衍. 临床标本中巨细胞病毒检测方法学的比较及其在小儿巨细胞病毒感染中的应用[D]. 青岛:青岛大学,2016.
- [11] 刘玮,钱继红,朱天闻,等. 围生期巨细胞病毒感染 5 年临床总结 [J]. 中国当代儿科杂志,2016,18(2):99-104.
- [12] 朱宇宁,尚世强,陈英虎,等. TORCH 实验室规范化检测与临床应用专家共识[J]. 中华检验医学杂志,2020,43(5):553-561.
- [13] DAVIS NL, KING CC, KOURTIS AP. Cytomegalovirus infection in pregnancy[J]. Birth Defects Res, 2017, 109(5): 336-346.
- [14] LAGROU K, BODEUS M, VAN RANST M, et al. Evaluation of the new architect cytomegalovirus immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgG avidity assays[J]. J Clin Microbiol, 2009, 47(6): 1695-1699.
- [15] KILBY MD, VILLE Y, ACHARYA G. Screening for cytomegalovirus infection in pregnancy[J]. BMJ, 2019, 367: 16507.
- [16] LERUEZ-VILLE M, FOULON I, PASS R, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy: State of the science[J]. Am J Obstet Gynecol, 2020, 223(3):330-349.
- [17] 周乙华,胡娅莉. 妊娠期 TORCH 血清学筛查选择和结果评价[J]. 中国产前诊断杂志(电子版),2012,4(2):22-25.
- [18] 刘子林,汪涛,张齐龙,等. 病原高通量测序在中枢神经系统感染患者中的应用效果[J]. 医疗装备,2023,36(8):53-55.
- [19] CHEN Y, ZHAO L, WANG Y, et al. SeqCNV: a novel method for identification of copy number variations in targeted next-generation sequencing data [J]. BMC Bioinformatics,2017,18:147.
- [20] 李林海,陈丽丹,肖斌,等. 宏基因组测序在感染性疾病病原体检测中的应用[J]. 传染病信息,2018,31(01):15-18.
- [21] A MACE, MA Tuke, JS BECKMANN, et al. New quality measure for SNP array based CNV detection [J], Bioinformatics, 2016,32(21): 3298-3305.
- [22] DESHENG LIANG, YING PENG, WEIGANG Lv, et al. Copy Number Variation Sequencing for Comprehensive Diagnosis of Chromosome Disease Syndromes[J], The Journal of Molecular Diagnostics, 2014, 16(5): 519-526.
- [23] 赵和永. 全基因组拷贝数变异检测在产前高通量测序异常信号分析中的应用研究[D]. 济南:山东大学,2015.

(收稿日期:2023-05-26)

编辑:刘邓浩