

基于实时荧光定量 PCR 方法分析新生儿先天性巨细胞病毒感染的临床特征

朱娟 李玲 易慧 刘渊 张琪 詹文丽*

(广东省妇幼保健院 医学遗传中心, 广东 广州 510010)

【摘要】 目的 探讨新生儿先天性巨细胞病毒感染 HCMV-DNA 载量与新生儿临床症状的关系。**方法** 回顾性研究 2016 年 1 月至 2018 年 12 月在广东省妇幼保健院新生儿科收治的出生 14 天内新生儿, 采用实时荧光定量 PCR 方法进行 HCMV-DNA 检测确认 75 例先天性 HCMV 感染, 分析新生儿 HCMV-DNA 载量与临床特征、听力检测及疾病转归的关系。**结果** 75 例 HCMV 先天性感染新生儿常见的临床表现中黄疸占 76% (57/75)、肺炎占 74.7% (56/75)、贫血占 42.6% (32/75)、颅内出血占 36% (27/75), 其中 55 例为新生儿, 20 例为早产儿, 两组的贫血及室管膜下囊肿差异具有统计学意义。75 例感染新生儿尿中 HCMV-DNA 平均数值 1.79×10^5 copies/ml ($5.1 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^7$ copies/ml), 其中 56% (42/75) 的 HCMV-DNA 在 $5.0 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^2$ copies/ml 之间, 18.6% (14/75) 的 HCMV-DNA 在 $1.0 \times 10^3 \sim 9.9 \times 10^3$ copies/ml 之间, 25.3% (19/75) $> 9.9 \times 10^3$ copies/ml。将 HCMV-DNA 数值与临床症状进行分析, 发现 24 例贫血新生儿 HCMV-DNA ($\geq 1.0 \times 10^3$ copies/ml) 明显高于 18 例非贫血新生儿 ($< 1.0 \times 10^3$ copies/ml), 差异具有统计学意义。**结论** 新生儿先天性 HCMV 感染时的主要临床表现为黄疸、肺炎、贫血、肺炎及颅内出血, 应及时进行尿 HCMV-DNA 检测, 为是否采用更昔洛韦抗病毒治疗提供诊疗依据。

【关键词】 巨细胞; 先天性感染; 实时荧光定量聚合链反应

【中图分类号】 R714.55 **【文献标识码】** A

Analysis of the clinical features of neonatal congenital cytomegalovirus infection based on real-time QF-PCR method

Zhu Juan, Li Ling, Yi Hui, Liu Yuan, Zhang Qi, Zhan Wenli*

Medical Genetics Center, Guangdong Women and Children Hospital, Guangzhou 511442, Guangdong, China

* Corresponding author; Zhan Wenli, E-mail: zhanwenli620@foxmail.com

【Abstract】 Objective Study on the relationship between HCMV-DNA load and clinical symptoms of neonates with congenital cytomegalovirus infection. **Methods** A retrospective study was conducted on newborns admitted to the Department of Neonatal Pediatrics of Guangdong Maternal and Child Health Hospital from January 2016 to December 2018. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to detect HCMV-DNA in 75 cases of congenital HCMV infection. The relationship between neonatal HCMV-DNA load and clinical characteristics, hearing test and disease outcome was analyzed. **Results** The common clinical manifestations of 75 newborns with HCMV congenital infection included jaundice (57%), pneumonia (74.7%), anemia (42.6%) and intracranial hemorrhage (36%). Among them, 55 cases were newborns and 20 cases were premature infants. There was significant difference in anemia and subependymal cyst between the two groups. The average value of HCMV-DNA in the urine of 75 infected

DOI: 10.13470/j.cnki.cjpd.2021.02.008

* 通讯作者: 詹文丽, E-mail: zhanwenli620@foxmail.com

newborns was 1.79×10^5 copies/ml ($5.1 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^7$ copies/ml, of which 56% (42) of the HCMV-DNA was between $5.0 \times 10^2 \sim 9.9 \times 10^2$ copies/ml. 18.6% (14) of HCMV-DNA is between $1.0 \times 10^3 \sim 9.9 \times 10^3$, 25.3% (19) $> 9.9 \times 10^3$ copies/ml. By analyzing the value of HCMV-DNA and clinical symptoms, it was found that the HCMV-DNA of 24 anemic newborns ($\geq 1.0 \times 10^3$ copies/ml) was significantly higher than that of 18 non-anemic newborns ($< 1.0 \times 10^3$ copies/ml). **Conclusions** The main clinical manifestations of neonatal congenital HCMV infection are jaundice, pneumonia, anemia, pneumonia and intracranial hemorrhage. Urinary HCMV-DNA should be detected in time to provide the basis for diagnosis and treatment of ganciclovir antiviral therapy.

【Key words】 Human cytomegalovirus; Congenital infection; Quantitative real-time polymerase chain reaction

人类巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)是发生母婴垂直传播疾病的常见原因,在发达国家,新生儿先天性 HCMV 感染率为 0.2%~2.4%^[1-3],我国的新生儿先天性 HCMV 感染率为 0.7%^[4,5]。大约 10%~15%的 HCMV 感染胎儿在出生时为有症状感染,临床表现包括胎儿生长受限、低出生体重和中枢神经系统以及多器官受累,导致大约 90%的存活婴儿出现神经系统后遗症。10%~15%的无症状先天性 CMV 感染的婴儿会出现长期后遗症,包括进行性感音神经性听力障碍和智力发育迟缓^[6]。在一项为新生儿筛查收集的干血样本研究中,在早产儿和低出生体重儿中先天性 HCMV 感染的患病率明显增高^[7],而在新生儿重症监护病房住院的婴儿中先天性 HCMV 感染的患病率也高于总体人口^[8,9]。有研究表明,早期诊断和抗病毒药物干预可以改善有症状感染儿童的神经预后,对先天性感染高危新生儿进行检测可以准确诊断和早期治疗。

有研究报道使用实时荧光定量 PCR 方法可以准确测量尿液中 HCMV-DNA copies/ml,并与新生儿症状程度存在一定的相关性,对 HCMV 先天性感染新生儿是否有后遗症风险是较好的评估指标。当 HCMV-DNA 拷贝数 5×10^4 copies/ml 时约 70%新生儿会出现神经系统发育异常,当 HCMV-DNA 拷贝数 $< 3.5 \times 10^3$ copies/ml 时仅有 4%新生儿会出现神经系统发育异常^[10],但与新生儿各系统损伤的关系尚未完全确定。本研究旨在通过对新生儿重症监护病房(neonatal intensive care unit, NICU)住院的婴儿进行尿液 HCMV-DNA 检测,分析先天性 HCMV 感染新生儿的临床特征、治疗及转归,并为后续的治疗方案提供思路。

1 资料和方法

1.1 研究对象 回顾性研究 2016 年 1 月至 2018 年 12 月在广东省妇幼保健院新生儿科收治出生 14 天内的新生儿,根据新生儿先天性 HCMV 感染的诊断标准^[11],对其进行尿液 HCMV-DNA 检测,其中 75 例新生儿诊断为先天性 HCMV 感染。排除其他先天性或围产期感染(如单纯疱疹病毒、梅毒)的新生儿。

1.2 研究方法

1.2.1 尿液标本 收集使用无菌尿液收集袋收集尿液后,转移到无菌样本管后,保存在 -20°C 以备检测。

1.2.2 HCMV-DNA 提取及检测 取 1ml 新生儿尿液严格按试剂盒说明书提取步骤进行 DNA 的提取后,取 $2\mu\text{l}$ 严格按照试剂盒说明书采用实时荧光定量法进行 PCR 扩增反应,每次 PCR 扩增反应均设置阴性对照进行质控,试剂盒均由中山大学达安基因公司提供。

1.2.3 总结先天性感染 HCMV 新生儿 HCMV-DNA 结果、临床症状、住院天数及疾病转归。

1.2.4 听力筛查 采用耳声发射筛查进行听力筛查,如果听力筛查发现异常,新生儿将接受更精确的听觉脑干反应、听觉稳态反应筛查。

1.3 统计学方法 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析,采用描述性方法对计数资料使用频数和率表示,对于计量资料以均值和标准差表示,两组定性资料间的比较采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况 共有 75 例 HCMV-DNA 检测阳

性新生儿,男婴 43 例,女婴 32 例。体重 810~3460g,平均体重(1620±96)g,年龄 1~14d,平均年龄(8.0±0.4)d,其中 20 例为足月儿,55 例为早产儿(28~36 孕周)。

2.2 临床诊断 根据国内外指南对 HCMV 先天性感染新生儿症状进行分类^[12],75 例 HCMV 先天性感染新生儿常见的临床表现中黄疸占 76%(57/75)、肺炎占 74.7%(56/75)、贫血占 42.6%(32/75)、颅内出血占 36%(27/75)。将足月儿及早产儿进行比较,发现贫血及室管膜下囊肿差异具有统计学意义。详见表 1。

表 1 75 例新生儿先天性巨细胞感染的临床特征

分类	例数 [例(%)] (n=75)	早产儿 [例(%)] (n=55)	足月儿 [例(%)] (n=20)	P
神经系统损伤				
颅内出血	27(36)	19(34.5)	8(40)	0.748
室管膜下囊肿	6(8.0)	2(3.6)	4(20.0)	0.021
脑室增宽	4(5.3)	3(5.5)	1(5.0)	0.938
脑白质软化	13(17.3)	8(14.5)	5(25.0)	0.290
循环血液系统				
黄疸	57(76.0)	45(81.8)	12(60.0)	0.051
血小板减少	8(10.7)	5(9.1)	3(15.0)	0.463
贫血	32(42.7)	28(50.9)	4(20.0)	0.017
心肌损害	7(9.3)	6(10.9)	1(5.0)	0.437
呼吸系统异常				
呼吸窘迫	32(42.6)	24(43.6)	8(40.0)	0.778
肺炎	56(74.7)	44(80.0)	12(60.0)	0.078
消化系统异常				
肝炎综合征	3(4.0)	1(1.8)	2(10.0)	0.110
坏死性小肠结肠炎	21(28)	15(27.3)	6(30.0)	0.816
消化道出血	7(9.3)	6(10.9)	1(5.0)	0.437
眼部异常				
视网膜出血	9(12.0)	6(10.9)	3(15.0)	0.630
视网膜病变	24(32.0)	19(34.5)	5(25.0)	0.433

2.3 HCMV-DNA 检测结果 75 例感染新生儿尿中 HCMV-DNA 平均数值(1.79×10⁵)copies/ml [(5.1×10²~2.5×10⁷)copies/ml],其中 56%(42/75)的 HCMV-DNA 在(5.0×10²~9.9×10²)copies/ml 之间,18.6%(14/75)的 HCMV-DNA 在(1.0×10³~9.9×10³)copies/ml 之间,25.3%(19/75)>9.9×10³copies/ml,根据结果及时使用更昔洛韦抗病毒治疗。将 HCMV-DNA 数值与临床症状进行分析,发现 24 例贫血新生儿 HCMV-DNA [≥(1.0×10³)copies/ml]明显高于 18 例非贫血新生儿[<(1.0×10³)copies/ml],差异具有统计学意

义。具体见表 2。

表 2 75 例新生儿 HCMV-DNA Copies/ml 数值与临床症状相关性分析

分类	<1.0×10 ³ copies/ml [例(%)]	≥1.0×10 ³ copies/ml [例(%)]	P
≤3 个系统受损	24(53.3)	21(46.7)	
>3 个以上系统受损	18(60.0)	12(40.0)	0.569
室管膜下囊肿			0.758
是	3(50.0)	3(50.0)	
否	39(56.5)	30(43.5)	
贫血			0.004
是	8(25.0)	24(75.0)	
否	25(58.1)	18(41.9)	
黄疸			0.093
是	35(61.4)	22(38.6)	
否	7(38.9)	11(61.1)	

2.4 听力测试 通过耳声发射筛查听力,共计 13 例未通过听力测试,其中 3 例为单侧听力测试未过,1 例为足月儿,12 例为早产儿,HCMV-DNA 数值高低与听力测试异常没有显著性差异。

2.5 HCMV 先天性感染 新生儿预后新生儿平均住院天数 39d(3~116)d,其中早产儿平均住院天数(41±5)d,足月儿平均住院天数(25±3)d。1 例死亡,17 例自动出院,均存在 3 及 3 个系统以上的损害。76%(57/75)新生儿痊愈出院。

3 讨论

新生儿巨细胞感染主要由宫内感染(先天性感染)、分娩期产道接触感染、产后母乳喂养感染等途径获得感染^[13],约 5%~10%的先天性 HCMV 感染新生儿有临床症状,临床表现为宫内发育迟缓、肝脾肿大、黄疸、皮疹、血小板减少、紫癜、小头畸形、颅内钙化^[6]。有 17%~20%将有异常的神经系统损伤,主要是先天性感音神经性耳聋(congenital sensorineural hearing loss,SNHL)、认知延迟、神经运动损伤、智力精神运动发育迟缓、视神经萎缩、患有脉络膜视网膜炎和广泛中央病变的婴儿可能有视觉障碍^[14,15]。在本研究中,75 例 HCMV 先天性感染新生儿常见的临床表现中黄疸占 76%(57/75)、肺炎占 74.7%(56/75)、贫血占 42.6%(32/75)、颅内出血占 36%(27/75),本研究将足月儿及早产儿进行比较,发现贫血及室管膜下囊肿差异具有统计学意义,这与 HCMV 先天性感染报道症状相似。由于 HCMV 感染临床表现为常为多系统损害,可能为 HCMV 感染可导致促炎性变化,对胎盘发育

和功能、病毒传播和胎儿存活率有重要影响^[16,17]。

对疑似 HCMV 感染新生儿进行 HCMV 筛查是有必要的,通过实时定量 PCR 方法对尿液中的 CMV-DNA 进行普遍筛查及早期检测,可识别有听力损失和认知延迟风险的婴儿,通过早期使用抗病毒药物干预可能会改善症状性感染的神经系统损害及预后^[18,19]。在本研究中,共计 17.3%(13/75)未通过听力测试,1 例为足月儿,12 例为早产儿,尿 HCMV-DNA 平均数值为平均数值(1.79×10^5)copies/ml [$(5.1 \times 10^2 \sim 2.5 \times 10^7)$ copies/ml],数值高低与听力测试异常没有显著性差异。Yamaguchi^[10]在 60 例 HCMV 感染的新生儿中,发现尿 HCMV-DNA 最高者的拷贝数是最低者的(4.6×10^5)倍,HCMV 感染和感音神经性耳聋(sensorineural hearing loss, SNHL)的新生儿尿 HCMV-DNA copies/ml 明显高于 HCMV 感染但没有 SNHL 的新生儿,由于 HCMV 感染而导致的 SNHL 表现为一种晚期听觉功能障碍,建议对于 HCMV 感染特别是拷贝数高的婴儿,需要仔细监测晚发性 SNHL 的发展并进行听力随访^[10,20]。本研究将 HCMV-DNA 拷贝数与临床症状进行分析,发现 24 例贫血新生儿 HCMV-DNA [$\geq (1.0 \times 10^3)$ copies/ml]明显高于 18 例非贫血新生儿 [$< (1.0 \times 10^3)$ copies/ml],差异具有统计学意义,这可能与 HCMV 损害血液系统有关,但与神经系统、呼吸系统、眼部系统差异无统计学意义。有学者报道高 HCMV-DNA 血症可预测无症状 HCMV 感染新生儿感染后遗症^[21],尿 HCMV-DNA 拷贝数高也可预测晚期神经系统损害^[10],建议尿 HCMV-DNA 拷贝数高的新生儿应进行 MRI 随访以便及时监测到神经系统异常。

HCMV 感染新生儿的预后与其临床症状及多系统损害情况相关。在本研究中,1 例足月新生儿死亡,17 例自动出院,均存在 3 及 3 个系统以上的损害,76%(57/75)新生儿痊愈出院。有研究报道 HCMV 感染新生儿期有神经系统损害的婴儿的预后比肝大、脾大或紫癜的预后差,分别有 73%和 30%的婴儿有严重的永久性后遗症^[22]。虽然先天性 HCMV 感染的新生儿表现在类型和频率上与有症状的婴儿相似,但总体预后较好。

综上所述,新生儿先天性 HCMV 感染时的主要临床表现为黄疸、肺炎、贫血、肺炎及颅内出血,通过检测尿 HCMV-DNA 可为早期使用抗病毒药物

干预提供诊疗依据,HCMV 感染新生儿的预后与及多系统损害有关。

参 考 文 献

- [1] REVELLO MG, GERNA G. Diagnosis and management of human cytomegalovirus infection in the mother, fetus, and newborn infant[J]. Clin Microbiol Rev, 2002, 15: 680-715.
- [2] PASS RF, ARAV-BOGER R. Maternal and fetal cytomegalovirus infection: diagnosis, management, and prevention[J]. F1000Res, 2018, 7:255.
- [3] ANTONA D, LEPOUTRE A, FONTENEAU L, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in France in 2010 [J]. Epidemiol Infect, 2017, 145(7):1471-1478.
- [4] JIN Q, SU J, WU S, et al. Cytomegalovirus infection among pregnant women in Beijing: Seroepidemiological survey and intrauterine transmissions[J]. J Microbiol Biotechnol, 2017, 27(5):1005-1009.
- [5] WANG S, WANG T, ZHANG W, et al. Cohort study on maternal cytomegalovirus seroprevalence and prevalence and clinical manifestations of congenital infection in China [J]. Medicine(Baltimore), 2017, 96(5):e6007.
- [6] STAGNO S, WHITLEY RJ. Herpesvirus infections of pregnancy. Part I: cytomegalovirus and Epstein-Barr virus infections[J]. N Engl J Med, 1985, 313: 1270-1274.
- [7] KHARRAZI M, HYDE T, YOUNG S, et al. Use of screening dried blood spots for estimation of prevalence, risk factors, and birth outcomes of congenital cytomegalovirus infection[J]. J Pediatr. 2010, 157:191-197.
- [8] PANHANI S, HEINONEN KM. Screening for congenital cytomegalovirus infection among preterm infants born before the 34th gestational week in Finland[J]. Scand J Infect Dis, 1994, 26:375-378.
- [9] SANTOS DV, SOUZA MM, GONCALVES SH, et al. Congenital cytomegalovirus infection in a neonatal intensive care unit in Brazil evaluated by PCR and association with perinatal aspects[J]. Rev Inst Med Trop Sao Paulo, 2000, 42:129-132.
- [10] YAMAGUCHI A, OH-ISHI T, ARAI T, et al. Screening for seemingly healthy newborns with congenital cytomegalovirus infection by quantitative real-time polymerase chain reaction using newborn urine: an observational study[J]. BMJ Open, 2017, 7:e013810.
- [11] 中华医学会围产医学分会. 先天性巨细胞病毒感染筛查与临床干预指南[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2019, 35(4): 417-423.
- [12] RAWLINSON WD, BOPANA SB, FOWLER KB, et al. Congenital cytomegalovirus infection in pregnancy and the neonate: Consensus recommendations for prevention, diagnosis, and therapy[J]. Lancet Infect Dis, 2017, 17(6): 177-188.
- [13] PECKHAM CS, JOHNSON C, ADES A, et al. Early

- acquisition of cytomegalovirus infection[J]. Arch Dis Child, 1987, 62:780-785.
- [14] Lombardi G, Garofoli F, Stronati M. Congenital cytomegalovirus infection: treatment, sequelae and follow-up [J]. J Matern Fetal Neonatal Med, 2010, 23(sup3, Suppl 3):45-48.
- [15] Karltorp E, Lofkvist U, Lewensohn-Fuchs I, et al. Impaired balance and neurodevelopmental disabilities among children with congenital cytomegalovirus infection[J]. Acta Paediatr, 2014, 103(11):1165-1173.
- [16] Scott Gm, Chow Ss, Craig Me, et al. Cytomegalovirus infection during pregnancy with maternofetal transmission induces a proinflammatory cytokine bias in placenta and amniotic fluid[J]. J Infect Dis, 2012, 205:1305-1310.
- [17] HAMILTON ST, SCOTT G, NAING Z, et al. Human cytomegalovirus-induces cytokine changes in the placenta with implications for adverse pregnancy outcomes[J]. PLoS One, 2012, 7:e52899.
- [18] NISHIDA K, MORIOKA I, NAKAMACHI Y, et al. Neurological outcomes in symptomatic congenital cytomegalovirus-infected infants after introduction of newborn urine screening and antiviral treatment[J]. Brain Dev, 2016, 38:209-216.
- [19] LANZIERI TM, DOLLARD SC, JOSEPHSON CD, et al. Breast milk-acquired cytomegalovirus infection and disease in VLBW and premature infants[J]. Pediatrics, 2013, 131:e1937-1945.
- [20] KOBAS M, BICKLE GRAZ M, TRUTTMANN AC, et al. Clinical characteristics, audiological and neurodevelopmental outcomes of newborns with congenital cytomegalovirus infection[J]. Swiss Med Wkly, 2018, 148:w14627
- [21] FORNER G, ABATE D, MENGOLI C, et al. High cytomegalovirus (CMV)DNA emia predicts CMV sequelae in asymptomatic congenitally infected newborns born to women with primary infection during pregnancy[J]. J Infect Dis, 2015, 212:67-71.
- [22] PASS RF, STAGNO S, MYERS GJ, et al. Outcome of symptomatic congenital CMV infection: results of long term longitudinal follow up[J]. Pediatrics, 1980, 66:758-762.

(收稿日期:2019-10-21)

编辑:宋文颖