

实时荧光定量聚合酶链式反应在获得性免疫缺陷综合征合并水痘-带状疱疹病毒感染中的应用

张伟¹ 马成杰² 张健³ 宋心成³ 吴苑妮³ 张瑞⁴ 李鑫⁴

【摘要】目的 研究水痘-带状疱疹病毒(VZV)核酸检测技术对获得性免疫缺陷综合征(AIDS)合并带状疱疹的诊断价值。**方法** 收集AIDS合并带状疱疹患者的血液和疱疹液,进行病毒DNA检测,同时进行血清抗-VZV IgM及T细胞亚群检测。**结果** 纳入AIDS合并带状疱疹患者共32例,入组患者疱疹液VZV DNA检测均为阳性,其中28例患者血液VZV DNA检测为阳性;仅有7例AIDS患者血清抗-VZV IgM阳性;疱疹液VZV DNA载量显著高于血液VZV DNA水平,差异有统计学意义($t = 3.173$ 、 $P = 0.0032$),血液及疱疹液VZV DNA检测阳性率显著高于血清抗-VZV IgM检测阳性率(87.5%、100% vs. 21.8%, $P < 0.001$)。**结论** VZV核酸检测技术对于AIDS合并水痘-带状疱疹病毒感染的病原学诊断具有重要价值。

【关键词】 获得性免疫缺陷综合征;水痘-带状疱疹病毒;实时荧光定量聚合酶链式反应

Value of real-time fluorescent quantitative polymerase chain reaction in acquired immunodeficiency syndrome complicated with varicella-zoster virus infection Zhang Wei¹, Ma Chengjie², Zhang Jian³, Song Xincheng³, Wu Yuanni³, Zhang Rui⁴, Li Xin⁴. ¹Infectious Diseases Department, ²Emergency Department of Infectious Diseases, ⁴Department 2ed of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing, 100015, China; ³Peking University Ditan Teaching Hospital, Beijing, 100015, China. ⁴Department 2ed of Integrated Chinese and Western Medicine, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China

Corresponding author: Li Xin, Email: leaxin@sina.com

【Abstract】Objective To investigate the diagnostic value of varicella zoster virus (VZV) nucleic acid detection in acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) complicated with herpes zoster. **Methods** The blood and herpes fluid of AIDS patients with herpes zoster were collected, the virus DNA was detected, and the serum anti-VZV IgM and T cell subsets were detected, respectively. **Results** A total of 32 patients with AIDS complicated with herpes zoster were included, all patients with VZV DNA positive in herpetic fluid, 28 patients with blood VZV DNA positive; only 7 AIDS patients with serum anti-VZV IgM positive, and the load of VZV DNA in herpetic fluid was significantly higher than that in blood, with significant difference ($t = 3.173$, $P = 0.0032$). The positive rate of VZV DNA in blood and herpetic fluid were significantly higher than that in serum anti-VZV IgM, with significant difference (87.5%, 100% vs. 21.8%; $P < 0.001$). **Conclusion** VZV nucleic acid detection was of great value in the etiological diagnosis of AIDS complicated with varicella zoster virus infection.

【Key words】 Acquired immune deficiency syndrome; Varicella-zoster virus; Real-time quantitative polymerase chain reaction

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2019.04.014

基金项目: 国家中医药行业科研专项(No. 201507005); “十三五”国家科技重大专项(No. 2017ZX10205501-001-002, No. 2017ZX09304027-001-010, No.2018ZX10101001-005-001); 北京市医院管理局重点医学专业发展计划(No. ZYLX201707)

作者单位: 100015 北京, 首都医科大学附属北京地坛医院感染二科¹、感染急诊²、中西医结合二科⁴; 100015 北京, 北京大学地坛医院教学医院³

通信作者: 李鑫, Email: leaxin@sina.com

人初次感染水痘-带状疱疹病毒(varicella-zoster virus, VZV)导致水痘,当机体免疫功能低下,潜伏于脊髓后根神经节的VZV可再次活化,导致带状疱疹。免疫功能正常人群VZV感染所致水痘或带状疱疹的诊断相对容易,但获得性免疫缺陷综合征(acquired immune deficiency syndrome, AIDS)患者因免疫功能低下,可表现为典型带状疱疹、疱疹泛化或不典型的顿挫型带状疱疹^[1-2]。在AIDS发病各个阶段可出现VZV亚临床活化^[3]。AIDS患者因免疫功能低下,血清VZV抗体IgM阳性率较低,为病原学诊断带来难度,本研究旨在比较AIDS合并带状疱疹患者血液及疱疹液VZV DNA检测与血清抗-VZV IgM检测结果,探讨VZV核酸检测在AIDS合并VZV感染者诊断中的应用价值,及相关检测与CD4⁺T淋巴细胞的关系,现报道如下。

资料与方法

一、研究对象

前瞻性分析2015年4月至2018年6月于首都医科大学附属北京地坛医院诊断为带状疱疹的32例AIDS患者的临床资料,均为男性,年龄23~47岁,平均(32.72±6.6)岁。

二、诊断标准

1. AIDS诊断:依据中华医学会感染病学分会颁布的《艾滋病诊疗指南第三版(2015版)》中相关诊断标准^[4]。

2. 带状疱疹诊断:带状疱疹的诊断标准依据《临床皮肤病学》^[5]:常见损害为在红斑上出现成群丘疹及水疱,损害沿一侧周围神经分布,呈带状排列,可伴有发热、患部附近淋巴结肿大,神经痛为本病的主要特征之一,皮疹消退后常遗留神经痛。

三、标本采集

采集EDTA抗凝血2 ml,同时给予碘伏局部消毒皮肤后以1 ml无菌注射器针头刺破疱疹,使用专用的病毒保存管采集疱疹液。

四、VZV核酸检测

1. 试剂仪器:VZV核酸测定试剂盒(荧光PCR法)由上海之江生物科技有限公司提供;荧光PCR仪型号为ABI 7500。

2. 方法:(1)血VZV DNA提取:取EDTA抗凝血2 ml,静置待自然分层,吸取上层血浆层及中间Buffy-coat层,13 000 r/min(离心半径r=8.2 cm)离心2 min,去尽上清,沉淀中直接加50 μl DNA提取液充分混匀,沸水浴10 min,13 000 r/min离心5 min,取上清备用。

(2)疱疹液VZV DNA提取:取50 μl于病毒保存液中保存的疱疹液,置于0.5 ml EP管,直接加50 μl核酸抽提液充分混匀,99℃水浴10 min,然后13 000 r/min离心10 min,取上清备用。

(3)试剂配制:内部对照品10倍稀释,取4 μl内部对照品,加入36 μl H₂O,震荡混匀数秒,3 000 r/min离心数秒后备用。取n×35 μl VZV核酸荧光检测混合液与n×1 μl经上述10倍稀释的内部对照品,以及n×0.4 μl酶(Taq+UNG)(n为反应管数),震荡混匀数秒,3 000 r/min离心数秒。

(4)加样:取上述混合液36 μl置于薄壁PCR反应管中,然后将已处理的样本、阳性对照品、H₂O各4 μl分别加入薄壁PCR反应管中,盖好薄壁PCR反应管盖,立即进行PCR扩增反应。

(5)PCR扩增:反应管置于定量荧光PCR仪上,循环条件为37℃、2 min,94℃、2 min,按93℃、15 s,-60℃、60 s循环40次,单点荧光检测温度为60℃,反应体系为40 μl。

五、血清抗-VZV IgM检测

1. 试剂:水痘-带状疱疹病毒IgM抗体定量检测试剂盒(酶联免疫法)由德国维润赛润研发有限公司提供。

2. 方法:(1)吸附:500 μl样本稀释液+10 μl血清混匀,吸出100 μl加入到另一管(40 μl吸附剂+60 μl稀释液)中混匀,室温静置15 min以上。

(2)加样:把水痘微孔条放到微孔板上,分别加上已经吸附好的血清100 μl,阴性对照1孔,阳性对照2孔(各100 μl)置37℃加速仪加速45 min。

(3)洗板:孵育后先甩掉血清,每孔加洗液200 μl,静置30 s后甩掉,重复3次,甩液机甩掉多余水分。

(4)加酶:每孔加酶100 μl,放加速仪加速20 min。

(5)洗板:同(3)。

(6)加底物:每孔加底物100 μl,加速仪加速30 min。

(7)加终止液:每孔加终止液100 μl。

(8)比色。

(9)按照厂家给的吸光度值计算出吸光度(A)值。

六、统计学处理

对患者的一般资料、临床表现、T细胞亚群和并发症等进行描述性分析。应用SPSS 22.0软件包进行统计学分析,患者疱疹液与血液中VZV含量为计量资料且呈正态分布,疱疹液与血液中VZV DNA载量比较采用成组t检验;疱疹液VZV病毒检测阳性率、血液标本VZV检测阳性率与血清抗-VZV IgM检测阳性率比较采用Fisher精确检验,以P<0.05为差异具有统计学意义。

结 果

一、入组患者的主要临床表现

1. 门诊及住院治疗:入组32例患者中1例为门诊患者,高效抗反转录病毒治疗(highly active antiretroviral therapy, HAART)后2个月出现带状疱疹。其余31例患者均为合并

各种机会性感染或肿瘤的住院患者,入院前出现疱疹者22例,住院期间出现疱疹者9例,均静脉给予阿昔洛韦或膦甲酸钠抗病毒治疗,同时给予营养神经及止痛治疗。

2. 皮疹部位:32例患者中皮疹发生在胸背部12例,额面部5例,股部4例,腰部8例,腿部1例,另有2例患者胸背部、腰部、肢体均出现皮疹,入组患者均伴有神经痛。

3. 带状疱疹的发生与抗HIV治疗时间的关系:HAART前有20例患者出现带状疱疹,HAART后有12例患者出现带状疱疹(HAART后3年发病4例,2年后发病2例,1年后发病1例,半年后发病1例,3个月后发病1例,2个月后发病2例,1个月后发病1例)

二、入组患者CD4⁺T淋巴细胞计数、血清抗体、血液与疱疹液核酸检测

32例AIDS合并带状疱疹患者CD4⁺T淋巴细胞计数为(68.97 ± 68.36)个/μl,其中7例患者抗-VZV IgM阳性,其CD4⁺T淋巴细胞计数为(140.10 ± 73.6)个/μl;余25例抗-VZV IgM为阴性,其CD4⁺T淋巴细胞计数为(49.04 ± 52.83)个/μl,非参数Mann Whitney test显示,抗-VZV IgM阴性与阳性患者CD4⁺T细胞差异有统计学意义($P = 0.0037$)。

对32例血液及疱疹液中VZV DNA进行检测,28例患者血液VZV DNA阳性,32例患者疱疹液VZV DNA阳性;且疱疹液中核酸定量水平(4.422 ± 1.583) log₁₀拷贝/ml显著高于血液中核酸水平(3.191 ± 1.218) log₁₀拷贝/ml,差异有统计学意义($t = 3.173$ 、 $P = 0.0032$)。血液和疱疹液VZV DNA阳性率与血清抗-VZV IgM阳性率差异均有统计学意义(P 均 < 0.001),见表1。

表1 血清VZV IgM抗体检测、核酸检测与疱疹液VZV核酸检测[例(%)]

指标	阴性	阳性
血清抗-VZV IgM	25 (78.1)	7 (21.8)
血液VZV DNA	4 (12.5)	28 (87.5)
疱疹液VZV DNA	0 (0.0)	32 (100.0)

注:血清抗-VZV IgM vs. 疹液VZV DNA: 校正 $\chi^2 = 37.81$ 、 $P < 0.001$;血清抗-VZV IgM vs. 血液VZV DNA: 校正 $\chi^2 = 25.22$ 、 $P < 0.001$

讨 论

VZV可在脊髓后根神经节中长期潜伏,具有嗜皮肤和神经的特性,因机体劳累、疾病和饮酒等各种诱因导致免疫功能降低时,病毒可重新复制增殖,引发周围神经炎和相应分布区域的皮肤炎症^[6],Lee研究发现^[7],基线CD4⁺T淋巴细胞 < 200个/μl、基线HIV-1 RNA > 5 log₁₀拷贝/ml均为AIDS患者HAART后出现带状疱疹的危险因素。AIDS患者免疫力低下,可反复出现VZV感染,临床表现为局限

性带状疱疹,也可表现为播散性带状疱疹^[8],皮疹形态不一,还有部分患者无皮疹表现,给临床诊断带来难度。

目前国内临床常用的VZV病原学急性期检测方法为血清抗体IgM检测,但免疫功能缺陷患者血清抗体IgM阳性率低,诊断价值有限。尽管VZV感染的实验检测方法较多,包括Tzanck涂片、电镜和免疫电镜、病毒分离、免疫学以及分子生物学等方法,但各方法均有其优点和不足^[9]。Tzanck涂片法优点为快速、简便和廉价,缺点为不能区分疱疹病毒类型,且需新鲜标本。电镜和免疫电镜具有高精度和灵敏的特点,但难以从整体上反映抗原含量,且受设备限制。病毒分离培养既费时,培养阳性率又低,不适合临床检测。免疫法则需细胞培养设备以及荧光显微镜,操作繁琐,结果判读易受主观因素影响,应用受到限制。分子生物学检测方法:PCR法具有较高的特异性和敏感性,但易因污染而产生假阳性。实时荧光定量PCR(realtime fluorescence quantitative PCR, RT-FQ-PCR)具有高敏感性和特异性,自动化程度高,操作简便,有助于区分VZV的潜伏感染和活动感染,对AIDS患者神经系统VZV感染的临床诊断和病毒性脑炎的治疗具有重要意义。与传统PCR法相比,最大优点是采用完全闭管检测,具有高敏感性,且更加快速、简便,省略了PCR后处理过程,避免了扩增产物污染引起的假阳性^[10]。

本研究结果也显示,应用FQ-PCR进行VZV DNA检测敏感性更高,本研究中入组32例AIDS患者中仅7例(21.8%)患者血清抗-VZV IgM阳性,提示核酸检测的阳性率显著高于抗体IgM检测,且疱疹液的VZV DNA阳性率显著高于血液VZV DNA的阳性率。血液标本及疱疹液标本病毒核酸显示,所有患者疱疹液VZV DNA阳性,且在相同操作规范下疱疹液中核酸检测水平显著高于血液标本,提示皮疹中病毒含量高,采集疱疹液进行病毒核酸检测对诊断的价值更高,同时也说明临床工作中尤其需要做好疱疹液接触隔离工作,避免交叉感染。本组病例检测血清抗-VZV IgM阴性患者CD4⁺T淋巴细胞计数显著低于血清抗-VZV IgM阳性患者,提示CD4⁺T淋巴细胞计数越低,抗-VZV IgM检测阳性率越低,与相关研究结果基本一致。有研究表明,AIDS患者血清抗-VZV IgM检测阳性率低可能与AIDS患者CD4⁺T淋巴细胞计数水平显著降低、机体免疫功能低下以及抗体形成少有关^[3, 11-12]。当CD4⁺T淋巴细胞计数 < 100个/μl时,抗-VZV IgM几乎低于检测下限,HAART后患者CD4⁺T淋巴细胞计数 > 300个/μl时,其免疫功能与健康对照人群类似^[13]。故AIDS患者中,仅凭抗-VZV IgM检测阴性结果不足以排除VZV感染。

一般典型带状疱疹在将要发生皮疹的部位出现皮疹1~4天前出现神经痛,本研究结果提示血液VZV DNA检测为敏感的检测手段,若能在未出现典型带状疱疹症状前就

对有助间神经痛、腹痛等可疑带状疱疹的AIDS患者开展早期血液VZV DNA检测则有助于提高早期诊断水平,减少误诊率。

FQ-PCR检测VZV,具有简易、微量、快速和准确的优点,VZV核酸检测技术可实现早诊断、早治疗,减少后遗症、皮肤感染及败血症等并发症的发生。

参 考 文 献

- [1] 杜健群, 卢斯汉, 郭庆. 艾滋病合并带状疱疹138例临床分析[J]. 广东医学, 2014, 35(3): 423-425.
- [2] 商婷, 彭明霞, 张燕. 以顿挫型带状疱疹为首诊的艾滋病1例[J]. 中国中西医结合皮肤性病学期刊, 2017, 16(1): 76-77.
- [3] Birlea M, Arendt G, Orhan E, et al. Subclinical reactivation of varicella zoster virus in all stages of HIV infection[J]. J Neurol Sci, 2011, 304(1-2): 22-24.
- [4] 中华医学会感染病学分会艾滋病学组. 艾滋病诊疗指南第三版(2015版)[J]. 中华临床感染病杂志, 2015, 8(5): 385-401.
- [5] 赵辨主编. 临床皮肤病学[M]. 3版. 南京: 江苏科学技术出版社, 2001: 300-302.
- [6] Steiner I, Kennedy PG, Pachner AR. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster[J]. Lancet Neurol, 2007, 6(11): 1015-1028.
- [7] Lee YC, Hung CC, Tsai MS, et al. Incidence and risk factors of herpes zoster in human immunodeficiency virus-positive patients initiating combination antiretroviral therapy in Taiwan[J]. J Microbiol Immunol Infect, 2018, 51(1): 38-44.
- [8] Vora RV, Anjaneyan G, Kota RKS, et al. Study of clinical profile of herpes zoster in human immunodeficiency virus positive and negative patients at a rural-based tertiary care center[J]. Indian J Sex Transm Dis, 2017, 38(1): 65-68.
- [9] 卢珍玲, 王官清, 程波. 水痘-带状疱疹病毒感染实验检测方法的研究进展[J]. 国际病毒学杂志, 2010, 17(1): 15-18.
- [10] Engelmann I, Petzold DR, Kosinska A, et al. Rapid quantitative PCR assays for the simultaneous detection of herpes simplex virus, varicella zoster virus, cytomegalovirus, Epstein-Barr virus, and human herpesvirus 6 DNA in blood and other clinical specimens[J]. J Med Virol, 2008, 80(3): 467-477.
- [11] Weinberg A, Wiznia AA, LaFleur BJ, et al. Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immunity in HIV-infected children receiving highly active antiretroviral therapy[J]. J Infect Dis, 2004, 190(2): 267-270.
- [12] L'Huillier AG, Ferry T, Courvoisier DS, et al. Impaired antibody memory to varicella zoster virus in HIV-infected children: low antibody levels and avidity[J]. HIV Med, 2012, 13(1): 54-61.
- [13] De Castro N, Carmagnat M, Kernéis S, et al. Varicella-zoster virus-specific cell-mediated immune responses in HIV-infected adults[J]. AIDS Res Hum Retroviruses, 2011, 27(10): 1089-1097.

(收稿日期: 2018-10-11)

(本文编辑: 孙荣华)

张伟, 马成杰, 张健, 等. 实时荧光定量聚合酶链式反应在获得性免疫缺陷综合征合并水痘-带状疱疹病毒感染中的应用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志(电子版), 2019, 13(4): 340-343.