

# 不同保存时间对血浆标本中人巨细胞病毒载量的影响

张 玲, 张清禄(陕西省渭南市中心医院检验科 714000)

**【摘要】** 目的 研究 4 ℃ 条件下存放 30 d 后血浆中人巨细胞病毒 DNA 的稳定性。方法 选择进行造血干细胞移植的 150 例患者的血浆标本, 将其按照人巨细胞病毒 DNA 载量分为 3 组: 低载量组 ( $n=50$ , 人巨细胞病毒 DNA 载量为 300~1 000 copy/mL)、中载量组 ( $n=50$ , 人巨细胞病毒 DNA 载量为 >1 000~10 000 copy/mL) 和高载量组 ( $n=50$ , 人巨细胞病毒 DNA 载量为 >10 000~100 000 copy/mL)。标本采集后 2 h 内完成基线载量(0 d)检测, 其余血浆在 4 ℃ 条件下保存, 分别在保存 1、2、3、7、14、21、30 d 时检测人巨细胞病毒载量。结果 低、中、高载量组标本在保存 1、2、3、7、14、21、30 d 后, 其人巨细胞病毒载量与 0 d 结果比较, 差异均无统计学意义 ( $P>0.05$ )。结论 血浆标本在 4 ℃ 条件下存放 30 d 对人巨细胞病毒载量检测结果无影响。

**【关键词】** 保存时间; 血浆; 标本; 人巨细胞病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2015.20.042 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2015)20-3078-02

**Influence of different storage time on giant cell viral load in plasma specimen** ZHANG Ling, ZHANG Qing-lu (Department of Clinical Laboratory, Weinan Municipal Central Hospital, Weinan, Shaanxi 714000, China)

**【Abstract】 Objective** To study the stability of cytomegalovirus (CMV) DNA in plasma after 30 d storage under 4 ℃. **Methods** The plasma samples from 150 patients undergoing hematopoietic stem cell transplantation were selected and divided into 3 groups according to DNA loads of human CMV: low load group ( $n=50$ , CMV DNA loads 300–1 000 copy/mL), middle load group ( $n=50$ , CMV DNA load 1 000–10 000 copy/mL) and high loads group ( $n=50$ , CMV DNA loads 10 000–100 000 copy/mL). The base line load (0 d) detection was completed within 2 d after sample collection, the other plasma was stored under the condition of 4 ℃. The human CMV load was detected on 1, 2, 3, 7, 14, 21, 30 d storage. **Results** The 150 samples were matched for different time points, cytomegalovirus loads of 1, 2, 3, 7, 14, 21, 30 days compared with baseline, the difference had no statistical significance ( $P>0.05$ ). **Conclusion** The plasma sample after 30 d storage under 4 ℃ has no influence on the detection results of CMV load.

**【Key words】** storage time; plasma; sample; human cytomegalovirus

人巨细胞病毒实质是一种有包膜的双链 DNA 病毒, 是疱疹病毒科  $\beta$  属。人巨细胞由 220~245 kb 的基因组成, 直径约 200 nm<sup>[1]</sup>。它是人类先天性病毒感染的主要病原体, 在人群中的感染率极高, 是器官移植、艾滋病患者等免疫力低下人群常见的感染和死亡原因<sup>[2-6]</sup>。由于患者发生人巨细胞病毒感染后无明显临床症状, 或者其所致的疾病症状没有特异性, 因此人巨细胞病毒感染必须依靠实验室诊断。目前临床上常用的人巨细胞诊断方法为病毒抗原检测、病毒分离培养、病毒核酸检测和特异性抗体检测<sup>[7-8]</sup>。实时荧光定量 PCR (RT-PCR) 检测可以及时反映人巨细胞病毒的活动状态, 所以使用范围最广。目前, 专家对不同标本保存温度和保存时间对人巨细胞病毒 DNA 稳定性的影响意见不一<sup>[9-10]</sup>。本研究选取 2013 年 9 月至 2014 年 9 月在本院进行造血干细胞移植的 150 例患者的血浆标本, 研究 4 ℃ 条件下保存 30 d 后血浆中人巨细胞病毒 DNA 的稳定性, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 收集 2010 年 9 月至 2014 年 9 月在本院进行造血干细胞移植的 150 例患者的血浆标本。150 例患者中, 急性淋巴细胞性白血病 38 例, 急性髓系细胞白血病 40 例, 慢性粒细胞白血病 34 例, 多发性骨髓瘤 11 例, 骨髓增生异常综合征 10 例, 非霍奇金淋巴瘤 8 例, 其他血液病 9 例; 男性 86 例, 女性 64 例, 年龄 3~50 岁, 平均 (22.38±2.57) 岁。

**1.2 分组方法** 将所获血浆标本按照人巨细胞病毒的 DNA

载量分为 3 组: 低载量组 (300~1 000 copy/mL), 327~948 copy/mL, 平均 714 copy/mL, 共 50 份标本; 中载量组 (>1 000~10 000 copy/mL), 1 027~8 927 copy/mL, 平均 4 873 copy/mL, 共 50 份标本; 高载量组 (>10 000~100 000 copy/mL), 23 802~92 749 copy/mL, 平均 57 426 copy/mL, 共 50 份标本。

**1.3 RT-PCR** 将采集的血液标本分别进行编号, 放置于含 EDTA 的抗凝管 (江西精致科技有限公司提供) 中, 立即送检, 700×g 离心 10 min, 离心后取 1 mL 无溶血的血浆标本进行 RT-PCR 检测, 其余血浆标本置于 4 ℃ 保存, 分别在保存 1、2、3、4、7、14、21、30 d 时进行 RT-PCR 检测, 每次检测前都要进行离心去除杂质。使用人巨细胞病毒核酸定量检测试剂盒 (中山大学达安基因股份有限公司提供) 进行核酸提取及 RT-PCR 检测。将 50  $\mu$ L 提取液与 50  $\mu$ L 血浆混合均匀, 100 ℃ 保温 10 min, 1 200 r/min 离心 5 min, 取上层清液 5  $\mu$ L 进行 PCR 扩增, 扩增条件: 93 ℃ 预变性 2 min, 93 ℃ 45 s, 55 ℃ 50 s, 循环 10 次, 93 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 循环 30 次, 在退火阶段监测荧光。每次检测都包含空白对照、阳性对照和阴性对照, 判断是否存在 PCR 抑制和假阳性结果。所有标本由相同的实验人员在相同的实验条件下进行, 实验室保持在 22~25 ℃, 相对湿度 (65±5)%。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS17.0 统计软件包对数据进行分析和处理。病毒载量数据需进行对数 (log) 转换, 计数资料比

较采用  $\chi^2$  检验, 计量资料采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 计量资料比较采用  $t$  检验, 以  $P < 0.05$  表示差异有统计学意义。

## 2 结 果

所有 150 份标本均被成功检测, RT-PCR 检测过程中无抑

制和假阳性现象出现。各组标本在保存 1、2、3、7、14、21、30 d 后, 人巨细胞病毒载量与 0 d 时比较差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

表 1 不同标本保存时间人巨细胞病毒载量 [ $\log(\text{copy/mL})$ ,  $\bar{x} \pm s$ ]

组别	0 d	1 d	2 d	3 d	7 d	14 d	21 d	30 d
低载量组	2.847 ± 0.112	2.842 ± 0.117	2.826 ± 0.142	2.841 ± 0.147	2.849 ± 0.122	2.825 ± 0.137	2.827 ± 0.125	2.838 ± 0.136
中载量组	3.573 ± 0.351	3.571 ± 0.284	3.618 ± 0.299	3.583 ± 0.284	3.576 ± 0.255	3.571 ± 0.273	3.579 ± 0.281	3.601 ± 0.283
高载量组	4.703 ± 0.251	4.683 ± 0.302	4.704 ± 0.262	4.672 ± 0.243	4.728 ± 0.238	4.726 ± 0.225	4.688 ± 0.204	4.732 ± 0.257

## 3 讨 论

RT-PCR 具有快速、敏感的特点, 是常用的人巨细胞病毒检测方法。但我国仍存在很多不具有病毒 DNA 检测能力的实验室, 在接受造血干细胞移植后, 只能将受试者的血液标本送至其他病毒学实验室进行检测。因此, 如何优化血液标本的采集、处理和保存, 以保证人巨细胞病毒载量的检测结果就显得尤为重要<sup>[10]</sup>。多数在本院进行移植的患者初次人巨细胞病毒载量检测结果为 300~100 000 copy/mL。因此, 本研究选取 2010 年 9 月至 2014 年 9 月在本院进行造血干细胞移植的 150 例患者的血浆标本(人巨细胞病毒载量为 300~100 000 copy/mL)进行 DNA 稳定性分析。

本研究结果显示, 低、中、高载量组标本保存 1、2、3、7、14、21、30 d 后, 其病毒载量与保存 0 d 时的检测结果比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。Abdul-Ali 等<sup>[11]</sup> 研究结果显示, 血浆标本保存 14 d 后其中的人巨细胞病毒载量无明显变化, 与本文结果相似, 但其所用的标本中有一半为阴性血浆稀释后的标本, 而且基线人巨细胞病毒载量并非真正的第 0 天的结果, 而是放置几天后的结果。本研究不仅选取标本有高、中、低 3 种不同载量的标本, 还做到了在标本采集后 2 h 内立即获取基线人巨细胞病毒载量。Schafer 等<sup>[12]</sup> 研究显示, 人巨细胞病毒 PCR 结果的假阳性会因血液标本的延时处理而增高。因此, 本次研究过程中每次测试前都对标本进行离心处理, 以此来确保 RT-PCR 检测的准确性。30 d 并非研究核酸稳定性的最长时间, Baleriola 等<sup>[13]</sup> 的研究中曾检验标本在  $-70 \sim -20$  °C 条件下保存 9 年后 HBV、HIV、HCV 载量的变化, 发现病毒载量的改变对临床判断的影响极小。但是用于治疗的生物制品中的人巨细胞病毒在保存 1、5 年后其载量是否有明显变化, 仍需大样本的实验进一步研究, 评估更长标本保存时间的人巨细胞病毒 DNA 的稳定性。由本研究结果可见, 对于进行人巨细胞病毒载量检测的血浆标本, 如果不能当天完成检测, 则可以在 30 d 内完成检测; 对于需要复检的临床结果, 可以在排除不可预测的血浆因素后, 在 30 d 内重复检测; 各实验室应针对自身条件优化对临床标本的保存条件。

综上所述, 血浆标本在 4 °C 条件下保存 30 d, 不影响人巨细胞病毒载量的检测结果。

## 参 考 文 献

[1] 余鹏春, 王左, 项贵明, 等. 实时荧光定量 PCR 方法对 3 种不同标本中巨细胞病毒检出率的比较[J]. 医学研究杂志, 2012, 41(2): 134-136.

[2] 殷宇明, 吴彤, 纪树荃, 等. 异基因造血干细胞移植后的巨细胞病毒肺炎 24 例分析[J]. 中国血液学杂志, 2011, 43(8): 516-520.

[3] Ljungman P. CMV: a warrior against leukemia? [J]. Blood, 2013, 122(7): 1101-1102.

[4] 龚芳, 潘宇红, 吕国忠, 等. 烧伤患者巨细胞病毒复发感染及其对患者预后的评估价值[J]. 中国实验诊断学, 2013, 17(1): 103-105.

[5] 惠起源, 魏晓萍, 冯义朝, 等. 巨细胞病毒 DNA 动态监测在预防肾移植术后巨细胞病毒性肺炎中的应用价值[J]. 临床消化病杂志, 2011, 23(1): 19-22.

[6] 王彦华, 吴学东, 冯晓勤, 等. 巨细胞病毒感染对重型  $\beta$  地中海贫血儿童异基因造血干细胞移植后早期 T 细胞亚群的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(7): 1008-1011.

[7] 董妞姐, 苏犁云, 叶丽, 等. 荧光定量 PCR 检测新生儿干血斑中巨细胞病毒 DNA 方法的建立及评价[J]. 中华检验医学杂志, 2014, 37(4): 261-265.

[8] 郭荣, 杜欣, 翁建宇, 等. 造血干细胞移植术后并发巨细胞病毒相关嗜血细胞综合征 1 例并文献复习[J]. 实用医学杂志, 2010, 26(16): 2968-2970.

[9] 刘川, 邹叶青, 石庆芝. 造血干细胞移植中人巨细胞病毒检测: 荧光定量聚合酶链反应的早期诊断价值[J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(28): 4563-4567.

[10] 谢丽, 易珍, 王建, 等. 存储时间对血浆中巨细胞病毒 DNA 稳定性的影响[J]. 实用医学杂志, 2014, 30(7): 1151-1153.

[11] Abdul-Ali D, Kraft CS, Ingersoll J, et al. Cytomegalovirus DNA stability in EDTA anti-coagulated whole blood and plasma samples[J]. J Clin Virol, 2011, 52(3): 222-224.

[12] Schafer P, Tenschert W, Schroter M, et al. False-positive results of plasma PCR for cytomegalovirus DNA due to delayed sample preparation[J]. J Clin Microbiol, 2000, 38(9): 3249-3253.

[13] Baleriola C, Johal H, Jacka B, et al. Stability of hepatitis C virus, HIV, and hepatitis B virus nucleic acids in plasma samples after long-term storage at  $-20$  °C and  $-70$  °C [J]. J Clin Microbiol, 2011, 49(9): 3163-3167.