

· 论著摘要 ·

PCR 早期诊断烧伤患者单纯疱疹病毒感染的研究

赵一博 陶白江 杨民 刘东兴 郭学瑛

烧伤患者合并单纯疱疹病毒(HSV)感染发生率较高,深度烧伤患者尤其容易受到 HSV 感染^[1]。笔者采用 HSV-PCR 法检测了 57 例烧伤患者的 HSV 感染率,现报道如下。

资料与方法

1. 临床资料与标本采集:笔者单位 1997 年 6 月~1999 年 1 月收治烧伤患者 57 例,烧伤面积 15%~80% TBSA。采集以上患者血清和创面拭子标本待检。

2. HSV 的检测及其 DNA 探针的制备:血清加入等渗盐水混匀,创面拭子置入等渗盐水中浸泡 5 min,混匀。按 HSV-PCR 检测试剂盒(解放军军事医学科学院五所提供)说明书提取待检标本的模板 DNA。按常规 PCR 方法检测 HSV,总反应体积 50 μl,反应条件:94℃ 预变性 5 min,94℃ 解链 40 s,56℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,共 35 个循环。采用常规方法分离纯化 DNA 扩增产物,按地高辛标记试剂盒(美国 Promega 公司)说明书制备 HSV DNA 探针。

3. PCR 扩增产物特异性的检测:采用斑点杂交法。按常规方法制作 DNA 斑点膜,置入预杂交液中 65℃ 水浴 12 h。采用含甲酰胺(体积分数 50%)的杂交系统,42℃ 杂交过夜。以 X-磷酸盐和硝基蓝四唑盐为碱性磷酸酶底物,出现蓝紫色斑点为阳性反应。

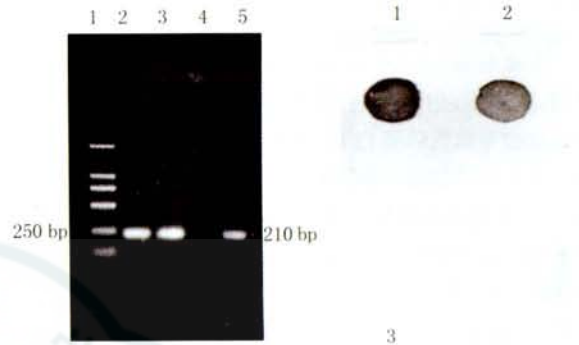
结果

1. HSV 检测结果:HSV-PCR 特异性扩增产物为 210 bp 的 DNA 片段(图 1)。所检测的 114 份标本中,84 份阴性,30 份阳性,总阳性率为 26.3%。其中,血清标本 13 例阳性,阳性率为 22.8%;创面拭子标本 17 例阳性(血清、创面拭子均为阳性者 13 例,其余 4 例仅创面拭子阳性),阳性率为 29.8%。血清 HSV-PCR 阳性出现在烧伤后第 4~10 天,创面拭子 HSV-PCR 阳性出现在烧伤后第 4~15 天。

2. DNA 斑点杂交结果:烧伤患者血清和创面拭子标本的 HSV-PCR 扩增产物 DNA 均出现特异性杂交信号,而阴性对照标本未出现特异性杂交信号(图 2)。

讨论

HSV 感染的直接证据是从体内分离检出 HSV,间接证据是机体抗 HSV 抗体滴度升高。临床上检测 HSV 的常用方法为分离病毒和检测抗体滴度,但前者因不适用于早期临床诊断,应用较少;后者除不适用于早期诊断外,还受到严重烧伤患者自身免疫功能抑制等因素的影响。本研究中所采用的



注:1. marker 2. 血清 3. 创面拭子 4. 阴性对照 5. 阳性对照
图 1 PCR 扩增产物电泳图谱



注:1. 血清 2. 创面拭子 3. 阴性对照
图 2 DNA 斑点杂交结果

PCR 法具有高度敏感性和特异性,可弥补以上方法的不足,适用于烧伤患者 HSV 感染的早期诊断。

HSV 能侵袭烧伤创面,造成侵蚀性损害。但临床上很难鉴别 HSV 的已感染创面与未感染创面^[1]。本研究结果显示,创面拭子标本中 HSV 阳性者为 29.8%,可为临床评估创面有无 HSV 感染提供参考。

本研究中,HSV-PCR 法所检出的阳性率与已报道的血清学方法所检出的结果一致^[2,3]。DNA 斑点杂交实验证明,DNA 扩增产物具有 HSV 特异性。本研究结果还显示,凡血清 HSV 阳性者(13 例,)其创面 HSV 也为阳性,提示 HSV 的血流播散与创面 HSV 感染密切相关。

在 25 d 的实验期中,血清 HSV-PCR 阳性出现在烧伤后第 4~10 天;创面 HSV-PCR 阳性出现在烧伤后第 4~15 天。可见继血清 HSV-PCR 转阴后,创面 HSV-PCR 仍可持续出现阳性。Bourdarias 等^[4]报道,HSV 培养阳性期是烧伤后第 7~21 天。HSV-PCR 阳性期与 HSV 培养阳性期之间有无联系,值得进一步研究。

参考文献

- 1 Hauden FG, Himel HN, Heggors JP. Herpesvirus infections in burn patients. *Chest*, 1994, 106(Suppl):15S-21S.
- 2 Matthews SCW, Levick PL, Coombes EJ, et al. Viral infections in a group of burned patients. *Burns*, 1980, 6:55-60.
- 3 Linnemann CC JR, MacMillan BG. Viral infections in pediatric burn patients. *Am J Dis Child*, 1981, 135:750-753.
- 4 Bourdarias B, Perro G, Curillas M, et al. Herpes simplex virus infection in burned patients: epidemiology of 11 cases. *Burns*, 1996, 22:287-290.

(收稿日期:2001-03-16)

(本文编辑:罗勤)

作者单位:100088 北京,第二炮兵总医院烧伤整形科