

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

刘川¹, 邹叶青¹, 石庆芝² (南昌大学第二附属医院, ¹分子医学实验室, ²血液科, 江西省南昌市 330006)

文章亮点:

- 1 人巨细胞病毒属疱疹病毒 B 亚科, 在中国人群中的感染率相当高(80%~100%), 正常人感染人巨细胞病毒后, 病毒以一种潜伏整合状态存在, 无临床症状。造血干细胞移植后由于大量应用免疫抑制剂使机体抵抗力降低, 潜伏病毒再激活, 可引起活动性人巨细胞病毒感染。
- 2 采用实时荧光定量聚合酶链反应方法动态监测造血干细胞移植受者血浆人巨细胞病毒 DNA 载量, 快速筛选出早期活动性人巨细胞病毒感染者, 进而指导临床用药, 可以预防和减少人巨细胞病毒病的发生, 提高造血干细胞移植受者的成活率。

关键词:

干细胞; 移植; 造血干细胞移植; 人巨细胞病毒; 实时荧光定量 PCR

主题词:

造血干细胞移植; 巨细胞病毒; 巨细胞病毒感染; 聚合酶链反应

摘要

背景: 动态监测造血干细胞移植受者血浆人巨细胞病毒载量, 快速筛选出早期活动性人巨细胞病毒感染者, 进而指导临床用药, 提高造血干细胞移植的成活率。

目的: 探讨荧光定量聚合酶链反应对造血干细胞移植患者人巨细胞病毒活动性感染的早期诊断价值。

方法: 收集 41 例造血干细胞移植患者共 656 份血标本, 应用实时荧光定量 PCR 方法动态监测血浆人巨细胞病毒 DNA 载量, 并与 60 例健康体检者血浆人巨细胞病毒 DNA 载量对比分析。

结果与结论: 656 份血标本中 96 份阳性, 病毒载量介于 $5.0 \times 10^2 - 1.0 \times 10^7$ IU/mL 之间。治疗有效者人巨细胞病毒 DNA 迅速转阴, 治疗耐药者持续阳性, 12 例连续阳性者 2 例死于巨细胞病毒活动性感染。实时荧光定量 PCR 方法检测人巨细胞病毒 DNA 适用于造血干细胞移植后巨细胞病毒活动性感染的早期诊断。

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.

Human cytomegalovirus detection in hematopoietic stem cell transplantation: value of fluorescence quantitative PCR in the early diagnosis

Liu Chuan¹, Zou Ye-qing¹, Shi Qing-zhi² (¹Laboratory of Molecular Medicine, ²Department of Hematology, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China)

Abstract

BACKGROUND: To improve the survival rate of transplanted hematopoietic stem cells, dynamic monitoring of plasma content of human cytomegalovirus (HCMV) and rapid screening of early active HCMV infection in hematopoietic stem cell transplantation recipients, thus to guide the clinical medication, is preferred.

OBJECTIVE: To evaluate the usefulness of fluorescence quantitative PCR assay for early detection of HCMV activation after hematopoietic stem cell transplantation.

METHODS: Real-time fluorescence quantitative PCR assay was applied for HCMV monitoring in 656 blood samples from 41 hematopoietic stem cell transplantation recipients and 60 control blood samples.

RESULTS AND CONCLUSION: In 656 blood samples, 96 samples were positive, and the HCMV DNA copies ranged from 5.0×10^2 to 1.0×10^7 IU/mL. Timely initiation of therapy resulted in the rapid clearance of DNA-viraemia but it recurred in short time by drug-resistant. Two cases from 12 positive recipients died from HCMV infection. The quantitative detection of HCMV DNA by real-time PCR is a rapid method for monitoring HCMV infection and the early diagnosis in patients after hematopoietic stem cell transplantation.

Subject headings: hematopoietic stem cell transplantation; cytomegalovirus; cytomegalovirus infections; polymerase chain reaction

Liu C, Zou YQ, Shi QZ. Human cytomegalovirus detection in hematopoietic stem cell transplantation: value of fluorescence quantitative PCR in the early diagnosis. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2014;18(28):4563-4567.

刘川, 男, 1979 年生, 江西省丰城市人, 汉族, 2005 年江西医学院毕业, 硕士, 副主任技师, 主要从事分子生物学方面的研究。

通讯作者: 刘川, 硕士, 副主任技师, 南昌大学第二附属医院分子医学实验室, 江西省南昌市 330006

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2014.28.022
[http://www.crter.org]

中图分类号:R394.2

文献标识码:B

文章编号:2095-4344

(2014)28-04563-05

稿件接受: 2014-06-18

Liu Chuan, Master, Associate chief technician, Laboratory of Molecular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Corresponding author: Liu Chuan, Master, Associate chief technician, Laboratory of Molecular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, Jiangxi Province, China

Accepted: 2014-06-18

0 引言 Introduction

人巨细胞病毒(HCMV)在人群中的感染率很高,发达国家约为60%,在发展中国家或者某些特殊人群中,感染率超过95%^[1]。造血干细胞移植成为近年来治疗血液病、自身免疫性疾病等的有效手段,但由于移植前的预处理使用了大量化疗和放疗,致使患者免疫力极度低下,体内潜伏的人巨细胞病毒复燃或经输血及供者干细胞而感染^[2]。人巨细胞病毒感染是造血干细胞移植受者早期的主要感染并发症及死亡原因,既往因人巨细胞病毒导致的间质性肺炎病死率高达80%以上。人巨细胞病毒感染可使造血功能重建延迟,抑制造血细胞增殖和分化,导致移植不能存活^[3]。人巨细胞病毒活动性感染能够诱导急性移植抗宿主病发生,同样移植抗宿主病也会伴随人巨细胞病毒感染增加。Cantoni等^[4]认为,巨细胞病毒感染和移植抗宿主病作为异基因造血干细胞移植后重要并发症,二者有明确的联系。目前认为,移植后人巨细胞病毒感染的发生不仅与移植后免疫功能低下及免疫重建缓慢有关,可能更重要的是与人巨细胞病毒感染时受者免疫功能异常有关^[5]。

实时荧光定量PCR检测血液中人巨细胞病毒-DNA载量,能提示人巨细胞病毒激活且体内病毒负荷大小,所以它能预测人巨细胞病毒疾病的发生并指导干预性治疗。实时荧光定量PCR通过检测人巨细胞病毒-DNA水平,监测病毒活跃程度,观察抗病毒治疗的效果有重要意义。研究资料表明,在人巨细胞病毒疾病发生之前,及时使用抗病毒药物治疗,可以有效控制病毒感染,预防和减少人巨细胞病毒疾病的发生,降低移植受者的死亡率^[6]。Torres等^[7]建议如血浆中人巨细胞病毒DNA $>4 \times 10^6$ IU/mL,即可诊断为活动性感染。Leruez-Ville等^[8]采用荧光定量PCR法和pp65抗原法同时对50例骨髓移植患者558份血标本进行检测,结果pp65检测出现17次阳性,荧光定量PCR法出现24次阳性,荧光定量PCR法平均比抗原检测法提前8 d出现阳性。可见荧光定量PCR法比抗原检测敏感,更利于早期检测人巨细胞病毒感染。因此,人巨细胞病毒动态监测对人巨细胞病毒疾病的早期诊断及抗病毒治疗,降低移植受者的死亡率极为重要。本研究采用实时荧光定量聚合酶链反应(real-time PCR)方法对41例造血干细胞移植患者外周血浆人巨细胞病毒DNA进行动态定量监测,探讨定量PCR法对人巨细胞病毒活动性感染的诊断价值及对临床用药的指导意义。

1 对象和方法 Subjects and methods

设计: 人巨细胞病毒-DNA载量检测。

时间及地点: 于2012年1至12月在南昌大学第二附属医院医学分子实验室完成。

对象: 南昌大学第二附属医院血液科收治的异基因外周血造血干细胞移植患者41例,男23例,女18例,年龄5-63岁,中位年龄37.6岁。其中急性髓系白血病8例(M₁1例,

M_{2a} 3例, M_{2b} 1例, M_{4a} 1例, M_{4b} 1例, M_{5b} 1例),急性淋巴细胞白血病10例(ALL-L₁ 4例, ALL-L₂ 6例),慢性髓系白血病16例(慢性期7例,加速期9例),骨髓增生异常综合征7例。41例患者中非血缘异基因造血干细胞移植12例,血缘异基因造血干细胞移植29例;HLA高分辨配型不全相合9例,HLA全相合移植32例。

诊断标准: 参考《血液病诊断及疗效标准(第3版)》^[9]。

纳入标准: ①移植类型均为异基因外周血造血干细胞移植。②常规进行移植后巨细胞病毒监测,直至停用全部免疫抑制剂。③供、受者均签署知情同意书,研究过程符合《医疗机构管理条例》。

另选择60名健康体检人群为对照组,各项体检指标均无明显异常,男35例,女25例,年龄3-61岁,中位年龄35.8岁。

方法:

预处理方案: 20例患者应用经典的Bu-Cy作为预处理方案:马利兰3.2 mg/(kg·d)×4 d联合环磷酰胺60 mg/(kg·d)×2 d;另21例采用Cy-TBI方案:具体为总剂量达12 Gy的全身照射分6次给予联合环磷酰胺 60 mg/(kg·d)×2 d;其中所有非血缘移植患者在预处理中加用抗胸腺细胞球蛋白(ATG)5 mg/(kg·d)×4 d。

造血干细胞动员、采集、回输: 41例供者接受重组人粒细胞集落刺激因子注射液(国产,商品名:吉赛欣)8-10 μg/(kg·d),连续5 d皮下注射,于第5天股静脉置管,每次使用细胞分离机循环10 000-14 000 mL,终产量200 mL,共采集2次;移植患者回输单核细胞数量为(8.15-22.5)×10⁸/kg。

移植抗宿主病预防: 全部采用短程甲氨喋呤加环孢素及霉酚酸酯方案。

感染预防: 移植前巨细胞病毒-DNA定量阴性的患者预处理前给予1周口服阿昔洛韦0.2 g/次。移植中及移植后:所有患者均应用阿昔洛韦口服0.2 g/次,3次/d或静脉阿昔洛韦5 mg/kg,每8 h 1次进行巨细胞病毒感染预防。移植中血制品均用辐照仪25 Gy照射,并采用巨细胞病毒学检测阴性的血制品。

植活标准: 所有患者于回输造血干细胞+1 d,予重组人粒细胞集落因子150 μg/d皮下注射促进造血,并每日监测外周血象。连续3 d不再使用细胞集落刺激因子时,中性粒细胞数量绝对值 $>0.5 \times 10^9 L^{-1}$ 的第1天为粒细胞植活时间,在不进行血小板输注的情况下,血小板计数连续7 d $>20 \times 10^9 L^{-1}$ 表示血小板植活。造血干细胞回输+30 d,所有患者复查骨髓,骨髓象为增生活跃或明显活跃,并送短串联重复序列(STR)检查,不同血型患者转变为供者血型为移植成功。

收集血标本: 41例患者于造血干细胞移植后每周采集2次抗凝静脉血(周一和周四),连续抽取8周,共计656份血标本,进行人巨细胞病毒DNA检测。

表 1 移植组和对照组血液标本人巨细胞病毒 DNA 检测结果

Table 1 Human cytomegalovirus-DNA test results in the blood samples of transplantation and control groups

人巨细胞病毒载量(IU/mL)	移植组(份)	对照组(份)
0-5.0×10 ²	560	58
5.0×10 ² -1.0×10 ³	9	2
1.0×10 ³ -1.0×10 ⁴	47	0
1.0×10 ⁴ -1.0×10 ⁵	26	0
1.0×10 ⁵ -1.0×10 ⁶	6	0
1.0×10 ⁶ -1.0×10 ⁷	8	0
合计	656	60

60名健康体检者分别采集抗凝静脉血1份, 进行人巨细胞病毒DNA检测。

DNA提取: 无菌操作采集患者EDTA抗凝静脉血2 mL, 使用淋巴细胞分离液分离外周血单个核细胞, 然后直接加DNA提取液50 μL充分混匀, 沸水浴10 min, 12 000 r/min离心5 min, 取上清液直接用于PCR或-20 °C冻存备用。

人巨细胞病毒DNA定量: 使用中山大学达安基因有限责任公司提供的人巨细胞病毒荧光定量试剂盒, 用ABI-7500扩增仪进行实时荧光定量PCR, 其扩增条件为: 93 °C预变性2 min, 93 °C变性45 s, 55 °C退火60 s, 10个循环; 93 °C变性30 s, 55 °C退火45 s, 30个循环。试剂盒提供的阳性标准品(10⁴-10⁷)以及阴性对照同时扩增, 得出所测样本中的核酸载量值, 用IU/mL表示。每次试验中, 阴性对照的Ct值(循环阈值)不显示任何数值, 检测下限为5.0×10² IU/mL。

主要观察指标: 41例造血干细胞移植患者共656份血标本的人巨细胞病毒DNA载量, 并与60例健康体检者血浆人巨细胞病毒DNA载量对比分析。

统计学分析: 统计分析由经过培训的第二作者完成。采用SPSS 17.0 软件进行统计学分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间均值比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 造血重建及植入情况 41例患者均获造血重建。中性粒细胞植活的中位时间为+11(+10至+16) d, 血小板植活的中位时间为+17(+15至+24)d。所有患者均于移植后+30 d行骨髓穿刺检查, 骨髓象为增生活跃或明显活跃, STR检测结果为完全供者嵌合。不同血型适时转变为供者血型。移植后+30 d, 41例达完全缓解标准, +365 d 32例均达到完全缓解标准。

2.2 实时荧光定量PCR检测结果 Real-time PCR共检测41例造血干细胞移植患者656份血标本, 其中12例共96份标本阳性, 人巨细胞病毒载量介于5.0×10²-1.0×10⁷ IU/mL之间。对照组2份标本阳性, 人巨细胞病毒载量介于5.0×10²-1.0×10³ IU/mL之间。移植组平均为(4.69±1.54)×10⁵ IU/mL,

表 2 移植组 12 例患者共 96 份标本人巨细胞病毒 DNA 阳性检测情况

Table 2 Twelve cases (96 specimens) of positive human cytomegalovirus-DNA

患者编号	人巨细胞病毒载量(IU/mL)	人巨细胞病毒动态监测	复发次数	人巨细胞病毒病	治疗转归
2	1.0×10 ⁵ -1.0×10 ⁶	连续阳性	2	间质性肺炎	持续转阴
3	5.0×10 ² -1.0×10 ⁴	间断阳性	0	无	持续转阴
5	1.0×10 ⁶ -1.0×10 ⁶	连续阳性	4	间质性肺炎	死亡
6	1.0×10 ⁴ -1.0×10 ⁵	连续阳性	0	间质性肺炎	持续转阴
9	5.0×10 ² -1.0×10 ³	间断阳性	0	无	持续转阴
13	1.0×10 ³ -1.0×10 ⁷	连续阳性	0	间质性肺炎	持续转阴
16	5.0×10 ² -1.0×10 ⁴	连续阳性	3	肝炎	持续转阴
18	5.0×10 ² -1.0×10 ³	间断阳性	0	无	持续转阴
21	1.0×10 ⁴ -1.0×10 ⁷	连续阳性	3	肠炎	死亡
26	5.0×10 ² -1.0×10 ³	间断阳性	0	无	持续转阴
31	5.0×10 ² -1.0×10 ³	间断阳性	0	无	持续转阴
37	1.0×10 ³ -1.0×10 ⁴	连续阳性	1	无	持续转阴

对照组平均为(11.6±2.21)×10² IU/mL。移植组与对照组均值比较采用 t 检验, $P < 0.01$ ($t=2.087$), 差异有显著性意义(表1)。

2.3 人巨细胞病毒DNA检测与人巨细胞病毒感染的治疗 Real-time PCR共检出12例患者阳性, 人巨细胞病毒载量在5.0×10²-1.0×10⁷ IU/mL之间, 其中7例患者表现为连续PCR阳性, 伴DNA拷贝数逐渐升高, 给予更昔洛韦治疗, 患者均在一两周后DNA转阴, 但仍有5例患者停药两三周后复发。其中5号患者共复发4次, 第4次复发时表现为对更昔洛韦耐药, DNA不能转阴, 很快死亡; 16号患者第3次复发改为磷甲酸钠后DNA转阴, 3, 9, 18, 26, 31号患者表现为非连续人巨细胞病毒DNA阳性, 人巨细胞病毒载量未超过1.0×10⁴ IU/mL, 给予阿昔洛韦预防治疗, 5例患者均未发展为人巨细胞病毒疾病(表2)。

3 讨论 Discussion

造血干细胞移植重建造血和免疫功能, 是恶性血液病的重要治疗手段, 近年来已经广泛应用于临床。人巨细胞病毒属于疱疹病毒科, 是一种特异性的DNA病毒, 为已知人类疱疹病毒中最大的一组病毒^[10]。造血干细胞移植后应用免疫抑制剂使机体抵抗力下降, 潜伏病毒重新激活, 引起人巨细胞病毒活动性感染^[11-15]。人巨细胞病毒感染可导致间质性肺炎、人巨细胞病毒性肠炎、人巨细胞病毒性肝炎、人巨细胞病毒性脑炎等, 是导致患者死亡的主要原因之一^[16-19]。Ruiz-Camps等^[20]报道, 在移植后的第1年里超过一半的患者会有人巨细胞病毒原发感染或再激活的实验室证据。所以, 建立敏感的人巨细胞病毒检测方法, 及时应用抗病毒治疗, 对于预防和减少人巨细胞病毒病的发生、降低移植受者的死亡率具有重要意义。

人巨细胞病毒的检测方法有病毒培养、病毒血清学检测、标志物的检测等。病毒分离法是诊断巨细胞病毒的金标准, 但由于巨细胞病毒生长缓慢、培养时间长, 不能满

足临床早期检测的需要^[21]。血清学检测灵敏度不高, 抗体出现时间晚, 一般在临床症状出现2周后才阳性, 而且即使阳性也只能为人巨细胞病毒感染提供间接证据^[22]。目前人巨细胞病毒标志物的检测中应用比较广泛的是人巨细胞病毒pp65抗原与人巨细胞病毒-DNA的检测。

Bhatia 等^[23] 研究示 pp65 抗原检测的灵敏度为 89.18%, 特异性为 100%, 因而 pp65 抗原的检测可早期诊断人巨细胞病毒感染, 同时还可用于监测抗病毒治疗的效果。而 PCR 定量技术测定人巨细胞病毒-DNA 相比 pp65 抗原检测更灵敏, 重复性更好^[24-25]。

人巨细胞病毒监测指导下的抢先治疗, 能有效降低人巨细胞病毒感染的发生^[26-28], Real-time PCR 等敏感监测技术具有较高预测价值^[29]。本研究采用 Real-time PCR 法诊断人巨细胞病毒感染, 共检出 12 例患者人巨细胞病毒阳性, 7 例患者为持续阳性, 表现为 DNA 拷贝数持续递增, 6 例发展为入巨细胞病毒病; 另有 5 例患者表现为间断性 PCR 阳性, DNA 拷贝数均未超过 1.0×10^4 IU/mL, 给予阿昔洛韦治疗, 患者均未发展到入巨细胞病毒病, 并最终人巨细胞病毒持续转阴。本组患者人巨细胞病毒病的发生率为 14.6%, 略低于文献报道, 可能与早期治疗有关^[30-32]。

更昔洛韦作为 DNA 聚合酶的抑制剂, 在体内能够抑制病毒 DNA 的复制, 达到抗病毒感染的效果^[33-42]。本研究临床疗效显示, 除 5 号患者第 4 次复发表现为对更昔洛韦耐药, 人巨细胞病毒-DNA 未能转阴, 其余患者均在更昔洛韦治疗一两周后, DNA 拷贝数降至 5.0×10^2 IU/mL 以下, 提示更昔洛韦治疗有效。本组患者于预处理方案期间, 常规应用阿昔洛韦预防移植后人巨细胞病毒感染, 从而降低了人巨细胞病毒感染的发生率, 相同的结果在许多研究中也得到证实^[43-45]。

综上所述, Real-time PCR 方法具有敏感性高, 快速、定量准确, 适用于造血干细胞移植患者人巨细胞病毒活动性感染的早期诊断, 并可指导临床用药。通过监测患者人巨细胞病毒-DNA, 发现阳性予早期干预性治疗, 使人巨细胞病毒转阴, 同时尽量减少易发生人巨细胞病毒病的高危因素, 从而减少人巨细胞病毒感染的发生, 尤其随着 HLA 不相合移植工作的广泛开展, 移植抗宿主病发生率逐渐增高, 有必要延长移植后人巨细胞病毒的监测和随访时间, 及时给予预防性或抢先治疗来减少人巨细胞病毒病发生的风险。

致谢: 感谢南昌大学第二附属医院血液科在收集病例资料上的帮助。

作者贡献: 实验设计为第一作者, 实施第一、二作者, 评估为第一作者, 资料收集为第一、三作者。第一作者成文, 第三作者审校, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 文章及内容不涉及相关利益冲突。

伦理要求: 南昌大学第二附属医院具有干细胞移植临床及研

究资质。

入组患者均签署知情同意书, 研究方案经医院道德伦理委员会批准。

学术术语: 实时荧光定量 PCR (real-time PCR) 是指在 PCR 反应体系中加入荧光基团, 利用荧光信号累积实时监测整个 PCR 进程, 最后通过标准曲线对未知模板进行总量分析或通过 Ct 值对模板进行相对定量。

作者声明: 文章为原创作品, 无抄袭剽窃, 无泄密及署名和专利争议, 内容及数据真实, 文责自负。

4 参考文献 References

- [1] Griffiths PD, Emery VC, Milne RC. Cytomegalovirus[A]// Douglas D, Richmand, Whitley RJ, ed. Clinical virology[M]. 3rd ed. ASM Press, 2009: 475-506.
- [2] 周文强, 石炳毅, 蔡明, 等. 器官移植受者术后巨细胞病毒感染的监测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 12(18):3479-3481.
- [3] Ichihara H, Nakamae H, Hirose A, et al. Immunoglobulin prophylaxis against cytomegalovirus infection in patients at high risk of infection following allogeneic hematopoietic cell transplantation. Transplant Proc. 2011;43(10):3927-3932.
- [4] Cantoni N, Hirsch HH, Khanna N, et al. Evidence for a bidirectional relationship between cytomegalovirus replication and acute graft-versus-host disease. Biol Blood Marrow Transplant. 2010;16(9):1309-1314.
- [5] Borchers S, Luther S, Lips U, et al. Tetramer monitoring to assess risk factors for recurrent cytomegalovirus reactivation and reconstitution of antiviral immunity post allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Transpl Infect Dis. 2011;13(3):222-236.
- [6] 赵晓魁, 刘代红, 许兰平, 等. 异基因造血干细胞移植后巨细胞病毒肺炎临床特点分析[J]. 北京大学学报(医学版), 2009, 41(5): 548-553.
- [7] Torres HA, Aguilera E, Safdar A, et al. Fatal cytomegalovirus pneumonia in patients with haematological malignancies: an autopsy-based case-control study. Clin Microbiol Infect. 2008; 14(12):1160-1166.
- [8] Leruez-Ville M, Ouachée M, Delarue R, et al. Monitoring cytomegalovirus infection in adult and pediatric bone marrow transplant recipients by a real-time PCR assay performed with blood plasma. J Clin Microbiol. 2003;41(5):2040-2046.
- [9] 张之南, 沈悝. 血液病诊断及疗效标准[M]. 3版. 北京: 科学出版社, 2007.
- [10] Muñoz-Cobo B, Solano C, Costa E, et al. Dynamics of cytomegalovirus (CMV) plasma DNAemia in initial and recurrent episodes of active CMV infection in the allogeneic stem cell transplantation setting: implications for designing preemptive antiviral therapy strategies. Biol Blood Marrow Transplant. 2011;17(11):1602-1611.
- [11] Kekik C, Besisik SK, Seyhun Y, et al. Relationship between HLA tissue type, CMV infection, and acute graft-vs-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: single-center experience. Transplant Proc. 2009;41(9):3859-3862.
- [12] Jang JE, Hyun SY, Kim YD, et al. Risk factors for progression from cytomegalovirus viremia to cytomegalovirus disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. Biol Blood Marrow Transplant. 2012;18(6):881-886.

- [13] van der Bij W, Speich R. Management of cytomegalovirus infection and disease after solid-organ transplantation. *Clin Infect Dis*. 2001;33 Suppl 1:S32-37.
- [14] 陈育红,赵晓生,刘开彦,等.造血干细胞移植后患者血浆巨细胞病毒DNA拷贝数与巨细胞病毒病的关系[J].中华医学杂志,2009,89(22): 1540-1543.
- [15] Eid AJ, Razonable RR. New developments in the management of cytomegalovirus infection after solid organ transplantation. *Drugs*. 2010;70(8):965-981.
- [16] Ariza-Heredia EJ, Neshor L, Chemaly RF. Cytomegalovirus diseases after hematopoietic stem cell transplantation: a mini-review. *Cancer Lett*. 2014 ;342(1):1-8.
- [17] 金欣,陈建魁,于农,等.血液系统恶性肿瘤患者巨细胞病毒和EB病毒定量检测的临床价值[J].国际检验医学杂志, 2011,32(7): 793-794.
- [18] 谢卫民,张曦,彭贵华,等.造血干细胞移植受者免疫抑制治疗与巨细胞病毒感染的关系[J].中南大学学报(医学版), 2010,35(11): 1162-1166.
- [19] 刘开彦.造血干细胞移植患者巨细胞病毒感染的诊治进展[J].中国实用内科杂志,2007,27(20):1597-1598.
- [20] Ruiz-Camps I, Len O, de la Cámara R, et al. Valganciclovir as pre-emptive therapy for cytomegalovirus infection in allogeneic haematopoietic stem cell transplant recipients. *Antivir Ther*. 2011;16(7):951-957.
- [21] Boeckh M, Boivin G. Quantitation of cytomegalovirus: methodologic aspects and clinical applications. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(3):533-554.
- [22] SY Y, YP C. The development of laboratory diagnosis of human cytomegalovirus infection. *Foreign Medical Sciences Section of Pediatric*. 2005; 32: 284-287.
- [23] Bhatia J, Shah BV, Mehta AP, et al. Comparing serology, antigenemia assay and polymerase chain reaction for the diagnosis of cytomegalovirus infection in renal transplant patients. *J Assoc Physicians India*. 2004;52:297-300.
- [24] Griscelli F, Barrois M, Chauvin S, et al. Quantification of human cytomegalovirus DNA in bone marrow transplant recipients by real-time PCR. *J Clin Microbiol*. 2001;39(12):4362-4369.
- [25] 翟文静,魏嘉琳,赵明峰,等.巨细胞病毒定量PCR与pp65抗原测定监测异基因造血干细胞移植巨细胞病毒感染的比较[J].中国实验血液学杂志,2009,17(6):1522-1526.
- [26] Boeckh M, Gooley TA, Myerson D, et al. Cytomegalovirus pp65 antigenemia-guided early treatment with ganciclovir versus ganciclovir at engraftment after allogeneic marrow transplantation: a randomized double-blind study. *Blood*. 1996;88(10):4063-4071.
- [27] Gerna G, Baldanti F, Middeldorp J, et al. Use of CMV transcripts for monitoring of CMV infections in transplant recipients. *Int J Antimicrob Agents*. 2000;16(4):455-460.
- [28] Einsele H, Ehninger G, Hebart H, et al. Polymerase chain reaction monitoring reduces the incidence of cytomegalovirus disease and the duration and side effects of antiviral therapy after bone marrow transplantation. *Blood*. 1995;86(7): 2815-2820.
- [29] Lu SC, Chin LT, Wu FM, et al. Seroprevalence of CMV antibodies in a blood donor population and premature neonates in the south-central Taiwan. *Kaohsiung J Med Sci*. 1999;15(10):603-610.
- [30] 张晓艳,李建勇,吴汉新,等.造血干细胞移植后对人巨细胞病毒感染病毒载量的检测[J].中华传染病杂志,2006,24(6):401-405.
- [31] 邱志祥,王茫信,王莉红,等.异基因造血干细胞移植后血巨细胞病毒定量监测及临床意义[J].中华内科杂志,2012,51(5):371-375.
- [32] 陈欢,刘开彦,许兰平,等.异基因造血干细胞移植后实时定量聚合酶链反应在巨细胞病毒感染诊断和治疗中的应用[J].中华血液学杂志,2009,30(2): 77-81.
- [33] Winston DJ, Ho WG, Bartoni K, et al. Ganciclovir prophylaxis of cytomegalovirus infection and disease in allogeneic bone marrow transplant recipients. Results of a placebo-controlled, double-blind trial. *Ann Intern Med*. 1993;118(3):179-184.
- [34] Crumacker CS. Ganciclovir. *N Engl J Med*. 1996;335(10): 721-729.
- [35] 李春元,陈本川.更昔洛韦的临床应用进展[J].国外医药:合成药生药制剂分册,1998,19(3):172.
- [36] 胡增建,蒋华良,杨玉社.抗病毒药物研究新进展[J].中国药理学通报,1996,12(5):385.
- [37] Tokimasa S, Hara J, Osugi Y, et al. Ganciclovir is effective for prophylaxis and treatment of human herpesvirus-6 in allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*. 2002;29(7):595-598.
- [38] 刘鑫荣.更昔洛韦对巨细胞病毒感染的治疗应用[J].国外医药:抗生素分册,1996,17(1):66.
- [39] Henkin CC, Griener JC, Ten Eick AP. Stability of valganciclovir in extemporaneously compounded liquid formulations. *Am J Health Syst Pharm*. 2003;60(7):687-690.
- [40] Emery VC, Hassan-Walker AF. Focus on new drugs in development against human cytomegalovirus. *Drugs*. 2002; 62(13):1853-1858.
- [41] Weiskittel P. Valganciclovir hydrochloride (Valcyte): a new antiviral agent. *Nephrol Nurs J*. 2003;30(1):93-95.
- [42] Bozkaya H, Yurdaydin C, Bozdayi AM, et al. Oral ganciclovir for treatment of lamivudine-resistant hepatitis B virus infection: a pilot study. *Clin Infect Dis*. 2002;35(8):960-965.
- [43] Griffiths P, Whitley R, Snyderman DR, et al. Contemporary management of cytomegalovirus infection in transplant recipients: guidelines from an IHMF workshop, 2007. *Herpes*. 2008;15(1):4-12.
- [44] Winston DJ, Yeager AM, Chandrasekar PH, et al. Randomized comparison of oral valganciclovir and intravenous ganciclovir for prevention of cytomegalovirus disease after allogeneic bone marrow transplantation. *Clin Infect Dis*. 2003;36(6): 749-758.
- [45] Meyers JD, Reed EC, Shepp DH, et al. Acyclovir for prevention of cytomegalovirus infection and disease after allogeneic marrow transplantation. *N Engl J Med*. 1988;318(2):70-75.