

巨细胞病毒实验室检测方法研究进展及其用于 新生儿筛查的可行性

王 晗 李廷栋 郭小怡综述 葛胜祥审校

国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心 分子疫苗学与分子诊断学国家重点实验室
厦门大学公共卫生学院(福建厦门 361102)

摘要: 人巨细胞病毒(HCMV)感染后大多数无明显的临床症状,但可终身潜伏,并在特定条件下被激活而感染。孕期发生的HCMV活动性感染会导致流产、死胎、出生缺陷等,造成严重的经济和社会负担。由于原发性和继发性HCMV感染均可导致新生儿先天性感染,而目前无有效方法可筛查孕期HCMV继发性感染。因此对新生儿进行全面的先天性HCMV筛查,以便及早干预从而减轻先天性HCMV感染后果。文章对HCMV实验室检测的方法作一综述,并且分析其用于新生儿筛查的可行性,以期能为新生儿先天性HCMV筛查方法的选择提供依据。

关键词: 人巨细胞病毒; 先天性感染; 新生儿筛查

Research progress in laboratory detection of cytomegalovirus and its feasibility analysis for neonatal screening Reviewer:
WANG Han, LI Tingdong, GUO Xiaoyi, Reviser: GE Shengxiang (National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361002, Fujian, China)

Abstract: Most of the human cytomegalovirus (HCMV) infection has no obvious clinical symptoms, but it can be latent for life and activated under specific conditions. HCMV active infection during pregnancy can lead to abortion, stillbirth, birth-defect and so on, which causes serious economic and social burdens. Both primary and secondary HCMV infection can lead to congenital infection of newborn, but there is still no effective method for the screening of HCMV secondary infection during pregnancy currently. Therefore, a comprehensive congenital HCMV screening for newborns is implemented for early intervention and thus reducing the consequences of congenital HCMV infection. In this paper, the methods of HCMV laboratory detection and its feasibility for neonatal screening are analyzed, in order to provide a basis for the selection of methods in neonatal congenital HCMV screening.

Key words: human cytomegalovirus; congenital infection; neonatal screening

人巨细胞病毒(human cytomegalovirus, HCMV)属于疱疹病毒科,是一种DNA病毒。HCMV感染一般无明显的临床症状,但可潜伏终身,并可发生机会性活跃^[1]。在器官移植患者中,HCMV活动性感染会导致全身性疾病^[2];孕期感染HCMV会导致胎儿先天性感染,造成死胎、流产或者出生缺陷,约20%的HCMV先天性感染者会留下终身后遗症,如神经性耳聋及发育迟缓等^[3,4],给社会 and 患者家庭带来严重的负担^[5,6]。HCMV IgM曾作为优生优育检测项目之一,广泛用于孕期筛查。但是,IgM在HCMV感染后可持续较长时间,会造成一定的假阳性^[7];同时,IgG阳性人群如果发生HCMV激活感染或者再次感染时,往往不会产生IgM抗体,但同样会导致先天性感染^[8]。因此,

目前专家已经达成共识,建议不再对孕妇进行HCMV感染的筛查,而是在新生儿中开展全面的HCMV先天性感染的筛查,以便及早的对感染者进行干预,从而减轻HCMV先天性感染造成的临床后果^[9]。本文对HCMV实验室检测的方法及其对用于新生儿筛查的可行性进行分析,以期能为新生儿先天性HCMV感染筛查方法的选择提供依据。

1 HCMV 实验室检测方法

HCMV实验室检测包括病毒学检测^[10]、抗体检测^[11](包括特异性抗体检测、抗体亲和力检测)、抗原检测以及核酸检测(包括DNA检测、mRNA检测)^[12,13]。不同检测方法的特点和检测性能见表1。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.81472015, 31670927)

1.1 病毒学检测

病毒学检测为诊断HCMV感染的金标准。1970年,通过病毒分离培养研究从出生到1岁的健康婴儿的HCMV排毒状况,结果表明,超过60%的健康婴儿存在原发性HCMV感染,并且没有临床症状^[14]。病毒学检测一般是从唾液或者尿液中分离病毒进行培养,需要2~6周才能观察到明显病变^[25]。近年来,病毒培养方法已经过改良,将病毒培养和免疫荧光技术结合,减少培养时间至16小时,且其灵敏度和特异度可达到100%和97.1%^[26]。但其操作仍然较为复杂,耗时也长,且需要无菌操作环境(表1)。

1.2 抗体检测

抗体检测主要包括IgG、IgM及IgG亲和力检测。由于HCMV感染具有普遍性,在发展中国家,HCMV IgG抗体阳性率高于90%;在发达国家,HCMV IgG抗体阳性率也高达50%^[27]。因此,根据IgG结果无法判断是否发生近期感染。IgM是近期感染常用的指标。但是,HCMV感染后,体内的HCMV-IgM可以持续时间较长,难以区分急性原发感染或者既往感染;同时,在已经感染过HCMV的人群中,HCMV激活感染或者再次感染时,HCMV-IgM也可能不出现阳转;且其他病毒感染也可导致HCMV IgM出现假阳性。因此,HCMV IgM阳性往往不能确定近期是否发生HCMV感染^[28,29]。

由于IgM检测存在假阳性问题,因此在IgM和IgG同时阳性的情况下,一般还会增加亲和力检测以判断是否发生近期感染。HCMV IgG亲和力检测对原发性感染以及母婴传播风险有一定的诊断意义,因此近年来的研究较多^[30-32]。IgG抗体亲和力(avidity index, AI) > 65%提示既往感染,而AI < 50%则提示近期原发感染^[33]。以Cytomegalovirus IgG avidity EIA WELL (RADIM, Rome, Italy)试剂盒检测孕妇抗体亲和力,并且以抗体亲和力作为判断标准,评估其诊

断HCMV母婴传播风险的价值,在妊娠6~18周时其灵敏度和特异度分别为100%和57.5%,若在妊娠21~23周时其灵敏度则只有60%,特异度可达到60.6%^[17]。

1.3 核酸检测

核酸检测包括DNA检测和mRNA检测,HCMV DNA检测最初在1988年用于艾滋病患者中HCMV检测^[34],并且发现HCMV PCR比标准培养法更灵敏。该方法可以在1~2天内完成,且仅需要20 μL血液,可用于临床标本的HCMV检测。之后又出现干血斑标本代替血液标本进行检测,其灵敏度和特异度均较高^[35]。由于HCMV感染后可以通过唾液和尿液排毒,近年来HCMV DNA检测用得较多的为唾液和尿液标本,其检测效果与血液标本相差不大^[36]。市场上HCMV DNA检测试剂盒很多,最常用的雅培HCMV PCR试剂盒,其灵敏度可达到64 copies/mL^[20]。

近年来兴起的HCMV mRNA检测一般针对PP67,而PP67 mRNA检测方法其检测灵敏度虽然只有20%,但特异度能达到93%,在诊断高浓度的病毒血症患者时具有高度的特异性和有效性^[21]。

1.4 抗原检测

抗原检测通常情况下是检测外周血单核细胞中是否存在HCMV抗原。研究表明,在肝移植患者中,抗原检测与核酸检测结果显著相关^[37];在造血干细胞研究中,抗原检测与核酸检测结果也具有相关性^[38]。HCMV抗原检测方法主要有免疫荧光法、免疫组织化学法、流式细胞分析方法和酶联免疫法。HCMV PP65在裂解早期表达,标志着HCMV的活动性感染^[39],且在HCMV病毒中含量较高,是目前HCMV抗原检测较为常用的检测靶标。

1.4.1 免疫荧光法 1977年,免疫荧光技术用于疱疹病毒(包括HCMV)抗原定量检测^[40]。随后,HCMV免疫荧光检测技术快速发展。研究显示,以外周血白

表1 HCMV感染检测方法的比较

方法	商品化试剂盒	仪器	耗时	通量	客观性	灵敏度/%	特异度/%	样本来源	实验室要求	仪器价格(元)	参考文献
病毒培养	-	普通显微镜	2~6周	1	较差	100	100	唾液或尿液	P2	6 000	[14-16]
抗体检测	HCMV IgG avidity EIA WELL	酶标仪	2小时	100	较好	100	57.50	血液	P1	30 000	[17-19]
核酸检测	雅培HCMV PCR试剂盒	荧光定量PCR仪	1d以内	10~100	较好	100	100	唾液或尿液	P1	350 000	[20-22]
抗原检测	Bartels/Argene HCMV试剂盒	荧光显微镜	1~2d	1	较好	81.00	99.80	血液	P1	140 000	[23, 24]

细胞中的即刻早期抗原作为检测靶标,相对于病毒培养的金标准,免疫荧光检测的灵敏度可达96%,特异度可达87.7%^[23]。目前市场上已经有多种HCMV免疫荧光检测试剂盒,认可度较高的是Biotest公司的HCMV Brite(Biotest Diagnostics, Denville, N.J.)试剂盒和Bartels/Argene的HCMV抗原血症检测试剂盒(Intracel Corp., Issaquah, Wash.),检测器官移植受者的白细胞标本,其灵敏度分别可达88%和81%,特异度可达99.5%和99.8%^[24]。2016年有文献报道,根据WHO标准的标准化检测,免疫荧光检测结果与PCR检测结果一致^[37, 41]。免疫荧光检测HCMV抗原一般一次检测需要1~2天的时间。

1.4.2 免疫组织化学法 1983年,免疫组织化学法应用于HCMV检测。首先是在HCMV肝炎的组织切片中检测到HCMV抗原^[42]。目前HCMV免疫组化商品化试剂盒在各种组织切片标本中已得到充分运用,例如CINA Kit, Argene试剂盒用于检测结肠组织中的HCMV抗原^[43]。免疫组化法由于需组织切片,操作较为复杂,一般耗时大概2天。

1.4.3 流式细胞仪技术 通过流式细胞术检测到成纤维细胞中的HCMV抗原;流式细胞术还可用于HCMV基因表达方面的基础研究以及诊断研究^[44]。流式细胞术不需要制作细胞涂片以及组织切片,因此耗时相对较短,一般3~5小时即可。目前已有的商品化HCMV流式检测试剂盒主要用于HCMV特异性CD4⁺细胞^[41]和CD8⁺细胞^[45]的检测,而非HCMV抗原检测。

1.4.4 酶联免疫法 研究发现,在肾移植患者中HCMV抗原检测是HCMV活动性感染的敏感性指标,在症状出现前即可检测到HCMV抗原,HCMV抗原变化比抗体变化早半个月到1个月,可作为早期检测手段,而ELISA检测灵敏度可达95%,特异度达100%^[46]。将HCMV PP65抗原检测与ELISA试剂结合所建立的检测HCMV PP65抗原的方法,与定量PCR检测结果一致,相对于PCR的敏感度为92.3%,特异度98.7%^[47]。HCMV ELISA抗原检测方法也不需要制作细胞涂片以及组织切片,耗时较短,通量较大,操作简单,相比其他方法,更适合大规模筛查。但是,目前尚无商品化的HCMV抗原ELISA检测试剂盒。

2 HCMV检测方法用于新生儿筛查的可行性分析

2.1 病毒培养

虽然病毒培养方法是HCMV感染检测的金标准,但是其检测时间较长,需要2~6周,改良之后还需要

进行免疫荧光检测,且通量较小,操作复杂,环境要求高(无菌培养),并且成本较高,目前只适用于实验室,不适合用于大量样本的筛查。

2.2 抗体检测

相比病毒培养,抗体检测更加简便、快捷。IgG抗体可以通过胎盘或母乳传递给新生儿,且在出生后的相当长一段时间内均不会消失。因此,IgG抗体不能反映新生儿是否发生HCMV先天性感染^[48]。由于胎儿的免疫系统发育尚不成熟,即便出现宫内感染,也不一定出现IgM阳转,因此IgM也不适用于新生儿先天性感染的筛查。此外,通过胎盘传递给新生儿的高亲和力的母源抗体会对结果造成一定的干扰,因此IgG抗体亲和力检测也不适合用于新生儿先天性感染的筛查。

2.3 HCMV DNA检测

HCMV DNA检测是目前用于新生儿先天性感染筛查的主要手段,但是唾液与尿液标本对于新生儿先天性感染的诊断效能一直存在争议。有文献报道,唾液和尿液的检测结果一致性可达到99.7%,因此两者可信度一致^[49];同时由于唾液相对于尿液易得,并且不存在粪便污染的情况,唾液可以代替尿液进行HCMV检测^[50];但也有研究显示,针对早产儿,唾液的检测灵敏度低于尿液^[51]。核酸检测灵敏度、特异度高,但核酸检测存在仪器昂贵,操作复杂,且容易污染,对环境的要求较高等问题,目前只用于实验室检测,并不适合于大规模的新生儿筛查。随着核酸检测技术的发展,已有检测成本以及耗材价格大大下降了PCR检测方法^[52],适合于偏远地区,若能解决核酸检测价格昂贵的问题,其不失为新生儿先天性感染筛查的一种发展方向。

2.4 抗原检测

抗原检测在器官移植患者HCMV检测中的灵敏度与特异度与核酸检测相当,为新生儿筛查提供另外一种可能性。但是,目前HCMV抗原检测主要基于免疫荧光法,需要采血分离外周血单个核细胞(PBMC)^[53],对新生儿而言,采血难度较大并且难以获得足量的血液满足检测需求。同时,免疫荧光法操作复杂、耗时长,不适用于新生儿筛查。相比免疫荧光法,酶联免疫法通量大,操作简便快速,自动化程度高,仪器价格相对较低,更适合大范围以及偏远地区筛查。但是,由于HCMV病毒主要存在于白细胞中,ELISA检测的灵敏度低于免疫荧光,且目前还没有商品化的试剂盒。随着酶联免疫方法学的发展,其检测灵敏度进一步提高,可以检测尿液或者唾液中的

HCMV病毒,达到无创筛查的目的;已有文献报道,PCR检测灵敏度可能过高,因为大多数病毒拷贝量较低的新生儿先天性感染者并不出现临床症状^[54]。因此,HCMV抗原检测ELISA法不失为新生儿先天性感染筛查策略的一种发展方向。

综上所述,HCMV筛查可以为先天性HCMV患儿进行早期干预和治疗提供依据,对降低先天性HCMV感染导致的临床后果以及家庭和社会负担均具有重要的意义^[55]。目前已有专家共识,推荐在新生儿中全面开展HCMV先天性感染的筛查。根据对目前HCMV感染的实验室诊断方法的总结和分析,核酸检测可以用于新生儿先天性感染筛查,但目前仍仅限于实验室检测,还不适合大规模筛查;基于酶联免疫法的抗原检测更快速、简便、自动化程度高,或许更适用于新生儿筛查,但在检测灵敏度方面还需要进一步提高。加快发展适用于新生儿筛查的诊断试剂,如基于酶联免疫法的抗原检测试剂,才能更好地推动新生儿先天性HCMV感染筛查工作的全面开展。

参考文献:

- [1] Soderberg-Naucler C. HCMV microinfections in inflammatory diseases and cancer [J]. *J Clin Virol*, 2008, 41(3): 218-23.
- [2] Griffiths P, Baraniak I, Reeves M. The pathogenesis of human cytomegalovirus [J]. *J Pathol*, 2015, 235(2): 288-297.
- [3] Fowler KB, Boppana SB. Congenital cytomegalovirus (CMV) infection and hearing deficit [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(2): 226-231.
- [4] Śmiechura M, Struzycka M, Konopka W. Congenital and acquired cytomegalovirus infection and hearing evaluation in children [J]. *Otolaryngol Pol*, 2014, 68(6): 303-307.
- [5] Korndewal M, Vossen A, Cremer J, et al. Disease burden of congenital cytomegalovirus infection at school entry age: study design, participation rate and birth prevalence [J]. *Epidemiol Infect*, 2016, 144(7): 1520-1527.
- [6] Korndewal MJ, Oudesluis-Murphy AM, Kroes AC, et al. Congenital cytomegalovirus infection: child development, quality of life and impact on daily life [J]. *Pediatr Infect Dis J*, 2017, 36(12): 1141-1147.
- [7] Drew RJ, Stapleton P, Abu H, et al. Pregnancy outcomes of mothers with detectable cmv-specific igm antibodies: a three-year review in a large irish tertiary referral maternity hospital [J]. *Infect Dis Obstet Gynecol*, 2015: 218080.
- [8] Lumley S, Patel M, Griffiths P. The combination of specific IgM antibodies and IgG antibodies of low avidity does not always indicate primary infection with cytomegalovirus [J]. *J Med Virol*, 2014, 86(5): 834-837.
- [9] Rawlinson WD, Boppana 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): e177-e188.
- [10] Reitter A, Buxmann H, Haberl A, et al. Incidence of CMV co-infection in HIV-positive women and their neonates in a tertiary referral centre: a cohort study [J]. *Med Microbiol Immunol*, 2016, 205(1): 63-71.
- [11] Lazzarotto T, Gabrielli L, Guerra B, et al. Diagnosis and prognosis of congenital CMV infection: a case report and review of the literature [J]. *Scand J Clin Lab Invest Suppl*, 2014, 74(sup244): 34-40.
- [12] Ozgu-Erdinc AS, Sen CH. Diagnosis of congenital cytomegalovirus antigenemia by immunohistochemical detection of immediate early antigen [J]. *Fetal Pediatr Pathol*, 2014, 33(1): 64-70.
- [13] McCoy MH, Post K, Sen JD, et al. qPCR increases sensitivity to detect cytomegalovirus in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue of gastrointestinal biopsies [J]. *Hum Pathol*, 2014, 45(1): 48-53.
- [14] Numazakinamio Y, Yano N, Morizuka T, et al. Primary infection with human cytomegalovirus: virus isolation from healthy infants and pregnant women [J]. *Am J Epidemiol*, 1970, 91(4): 410-417.
- [15] Distéfano AL, Alonso A, Martin F, et al. Human cytomegalovirus: detection of congenital and perinatal infection in Argentina [J]. *BMC Pediatr*, 2004, 4(1): 11.
- [16] Uberti-Foppa C, Lillo F, Terreni MR, et al. Cytomegalovirus pneumonia in AIDS patient - Value of cytomegalovirus culture from BAL fluid and correlation with lung disease [J]. *Chest*, 1998, 113(4): 919-923.
- [17] Lazzarotto T, Spezzacatena P, Varani S, et al. Anti-cytomegalovirus (anti-CMV) immunoglobulin G avidity in identification of pregnant women at risk of transmitting congenital CMV infection [J]. *Clin Diagn Lab Immunol*, 1999, 6(1): 127-129.
- [18] Blum A, Giladi M, Weinberg M, et al. High anti-cytomegalovirus (CMV) IgG antibody titer is associated with coronary artery disease and may predict post-coronary balloon angioplasty restenosis [J]. *Am J Cardiol*, 1998, 81(7): 866-868.
- [19] Mace M, Sissoeff L, Rudent A, et al. A serological testing algorithm for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women [J]. *Prenat Diagn*, 2004, 24(11): 861-863.
- [20] Clari MA, Bravo D, Costa E, et al. Comparison of the new Abbott Real Time CMV assay and the Abbott CMV PCR Kit for the quantitation of plasma cytomegalovirus DNAemia [J]. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2013, 75(2): 207-209.

- [21] Mengoli C, Cusinato R, Biasolo MA, et al. Assessment of CMV load in solid organ transplant recipients by pp65 antigenemia and real-time quantitative DNA PCR assay: Correlation with pp67 RNA detection [J]. *J Med Virol*, 2004, 74(1): 78-84.
- [22] Kleines M, Schellenberg K, Ritter K. Efficient extraction of viral DNA and viral RNA by the Chemagic viral DNA/RNA kit allows sensitive detection of cytomegalovirus, hepatitis B virus, and hepatitis G virus by PCR [J]. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(11): 5273-5276.
- [23] Revello MG, Percivalle E, Zavattoni M, et al. Detection of human cytomegalovirus immediate early antigen in leukocytes as a marker of viremia in immunocompromised patients [J]. *J Med Virol*, 1989, 29(2): 88-93.
- [24] St George K, Boyd MJ, Lipson SM, et al. A multisite trial comparing two cytomegalovirus (CMV) pp65 antigenemia test kits, biotest CMV brite and Bartels/Argene CMV antigenemia [J]. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(4): 1430-1433.
- [25] Cannon MJ, Schmid DS, Hyde TB. Review of cytomegalovirus seroprevalence and demographic characteristics associated with infection [J]. *Rev Med Virol*, 2010, 20(4): 202-213.
- [26] 方峰, 陈静, 聂兴草, 等. 人巨细胞病毒短时培养快速诊断改良技术的建立及其应用 [J]. *中华儿科杂志*, 2002, 40(7): 395-397.
- [27] Staras SA, Dollard SC, Radford KW, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus infection in the United States, 1988-1994 [J]. *Clin Infect Dis*, 2006, 43(9): 1143-1151.
- [28] Goodman A, Murray C, Watkins J, et al. CMV in the gut: a critical review of CMV detection in the immunocompetent host with colitis [J]. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2015, 34(1): 13-18.
- [29] Fowotade A, Okonko IO, Agbede OO, et al. High seropositivity of IgG and IgM antibodies against cytomegalovirus (CMV) among HIV-1 seropositive patients in Ilorin, Nigeria [J]. *Afr Health Sci*, 2015, 15(1): 1-9.
- [30] Prince HE, Lapé-Nixon M. Role of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity testing in diagnosing primary CMV infection during pregnancy [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2014, 21(10): 1377-1384.
- [31] Enders G, Daiminger A, Bäder U, et al. The value of CMV IgG avidity and immunoblot for timing the onset of primary CMV infection in pregnancy [J]. *J Clin Virol*, 2013, 56(2): 102-107.
- [32] Vauloup-Fellous C, Berth M, Heskia F, et al. Re-evaluation of the VIDAS® cytomegalovirus (CMV) IgG avidity assay: Determination of new cut-off values based on the study of kinetics of CMV-IgG maturation [J]. *J Clin Virol*, 2013, 56(2): 118-123.
- [33] Grangeot-Keros L, Mayaux MJ, Lebon P, et al. Value of cytomegalovirus (CMV) IgG avidity index for the diagnosis of primary CMV infection in pregnant women [J]. *J Infect Dis*, 1997, 175(4): 944-946.
- [34] Shibata D, Martin WJ, Appleman MD, et al. Detection of cytomegalovirus DNA in peripheral blood of patients infected with human immunodeficiency virus [J]. *J Infect Dis*, 1988, 158(6): 1185-1192.
- [35] Vauloup-Fellous C, Ducroux A, Couloigner V, et al. Evaluation of cytomegalovirus (CMV) DNA quantification in dried blood spots: retrospective study of CMV congenital infection [J]. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(11): 3804-3806.
- [36] Soetens O, Vauloup-Fellous C, Foulon I, et al. Evaluation of different cytomegalovirus (CMV) DNA PCR protocols for analysis of dried blood spots from consecutive cases of neonates with congenital CMV infections [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(3): 943-946.
- [37] Kamei H, Ito Y, Onishi Y, et al. Cytomegalovirus (CMV) monitoring after liver transplantation: Comparison of CMV Pp65 antigenemia assay with real-time PCR CALIBRATED to WHO international standard [J]. *Ann Transplant*, 2016, 21: 131-136.
- [38] Breda G, Almeida B, Carstensen S, et al. Human cytomegalovirus detection by real-time PCR and pp65-antigen test in hematopoietic stem cell transplant recipients: a challenge in low and middle-income countries [J]. *Pathog Glob Health*, 2013, 107(6): 312-319.
- [39] Kalejta RF. Tegument proteins of human cytomegalovirus [J]. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2008, 72(2): 249-265.
- [40] Zaia JA, Oxman MN. Antibody to varicella-zoster virus-induced membrane antigen: immunofluorescence assay using monodisperse glutaraldehyde-fixed target cells [J]. *J Infect Dis*, 1977, 136(4): 519-530.
- [41] Waldrop SL, Pitcher CJ, Peterson DM, et al. Determination of antigen-specific memory/effector CD4+ T cell frequencies by flow cytometry: evidence for a novel, antigen-specific homeostatic mechanism in HIV-associated immunodeficiency [J]. *J Clin Invest*, 1997, 99(7): 1739-1750.
- [42] Vanstapel MJ, Desmet VJ. Cytomegalovirus hepatitis: a histological and immunohistochemical study [J]. *Appl Pathol*, 1983, 1(1): 41-49.
- [43] D'Ovidio V, Vernia P, Gentile G, et al. Cytomegalovirus infection in inflammatory bowel disease patients undergoing anti-TNF α therapy [J]. *J Clin Virol*, 2008, 43(2): 180-183.
- [44] Torigoe S, Campbell DE, Torigoe F, et al. Cytofluorographic analysis of effects of interferons on expression of human cytomegalovirus proteins [J]. *J Virol Methods*, 1993, 45(2): 219-228.
- [45] Ouyang Q, Wagner WM, Zheng W, et al. Dysfunctional

- CMV-specific CD8+ T cells accumulate in the elderly [J]. *Exp Gerontol*, 2004, 39(4): 607-613.
- [46] Van Den Berg AP, Der Bij WV, Van Son WJ, et al. Cytomegalovirus antigenemia as a useful marker of symptomatic cytomegalovirus infection after renal transplantation—a report of 130 consecutive patients [J]. *Transplantation*, 1989, 48(6): 991-994.
- [47] 刘玲玲, 王亮, 李琳, 等. 人巨细胞病毒 PP65 抗原 ELISA 检测方法的建立 [J]. *免疫学杂志*, 2014, (6): 545-549.
- [48] Lanzieri TM, Kruszon-Moran D, Amin MM, et al. Seroprevalence of cytomegalovirus among children 1 to 5 years of age in the United States from the National Health and Nutrition Examination Survey of 2011 to 2012 [J]. *Clin Vaccine Immunol*, 2015, 22(2): 245-247.
- [49] Yamamoto AY, Mussi-Pinhata MM, Marin LJ, et al. Is saliva as reliable as urine for detection of cytomegalovirus DNA for neonatal screening of congenital CMV infection? [J]. *J Clin Virol*, 2006, 36(3): 228-230.
- [50] Cardoso ES, Jesus BL, Gomes LG, et al. The use of saliva as a practical and feasible alternative to urine in large-scale screening for congenital cytomegalovirus infection increases inclusion and detection rates [J]. *Rev Soc Bras Med Trop*, 2015, 48(2): 206-207.
- [51] Gunkel J, Wolfs TF, Nijman J, et al. Urine is superior to saliva when screening for postnatal CMV infections in preterm infants [J]. *J Clin Virol*, 2014, 61(1): 61-64.
- [52] Tanriverdi S, Chen L, Chen S. A rapid and automated sample-to-result HIV load test for near-patient application [J]. *J Infect Dis*, 2010, 201(Suppl 1): S52- S58.
- [53] Reuschel E, Barabas S, Zeman F, et al. Functional impairment of CMV-reactive cellular immunity during pregnancy [J]. *J Med Virol*, 2017, 89(2): 324-331.
- [54] Barbi M, Binda S, Caroppo S, et al. Neonatal screening for congenital cytomegalovirus infection and hearing loss [J]. *J Clin Virol*, 2006, 35(2): 206-209.
- [55] Cannon MJ, Griffiths PD, Aston V, et al. Universal newborn screening for congenital CMV infection: what is the evidence of potential benefit? [J]. *Rev Med Virol*, 2014, 24(5): 291-307.

(2017-07-10)

(本文编辑: 邹 强)

《信息与文献 参考文献著录规则》GB/T 7714—2015 发布

用该标准代替 GB/T 7714—2005《文后参考文献著录规则》。与 GB/T 7714—2005 相比, 主要技术变化如下。

——该标准的名称由《文后参考文献著录规则》更名为《信息与文献 参考文献著录规则》。

——根据该标准的适用范围和用途, 将“文后参考文献”和“电子文献”分别更名为“参考文献”和“电子资源”。

——在“术语和定义”中, 删除了参考文献无须著录的“并列题名”, 增补了“阅读型参考文献”和“引文参考文献”。根据 ISO 690: 2010(E) 修改了“文后参考文献”“主要责任者”“专著”“连续出版物”“析出文献”“电子文献”的术语、定义、英译名。

——在著录项目的设置方面, 为了适应网络环境下电子资源存取路径的发展需要, 本标准新增了“数字对象唯一标识符”(DOI), 以便读者快捷、准确地获取电子资源。

——在著录项目的必备性方面, 将“文献类型标识(电子文献必备, 其他文献任选)”改为“文献类型标识(任选)”; 将“引用日期(联机文献必备, 其他电子文献任选)”改为“引用日期”。

——在著录规则方面, 将“用汉语拼音书写的中国著者姓名不得缩写”改为“依据 GB/T 28039—2011 有关规定, 用汉语拼音书写的人名, 姓全大写, 其名可缩写, 取每个汉字拼音的首字母”。在增加了“阅读型参考文献的页码著录文章的起讫页或起始页, 引文参考文献的页码著录引用信息所在页”。在“页码”中增补了, “引自序言或扉页题词的页码, 可按实际情况著录”的条款。新增了“获取和访问路径”和“数字对象统一标识符”的著录规则。

——在参考文献著录用文字方面, 新增了“必要时, 可采用双语著录。用双语著录参考文献时, 首先用信息资源的原语种著录, 然后用其他语种著录”。

——为了便于识别参考文献类型、查找原文献、开展引文分析, 在“文献类型标识”中新增了“A”档案、“CM”舆图、“DS”数据集以及“Z”其他。

——各类信息资源更新或增补了一些示例, 重点增补了, 电子图书、电子学位论文、电子期刊、电子资源的示例, 尤其是增补了附视频的电子期刊、载有 DOI 的电子图书和电子期刊的示例以及韩文、日文、俄文的示例。