

· 论 著 ·

179 例血液病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率与患者年龄的关系*

陈昌国¹, 郭建巍¹, 杜 晴^{1,2}, 李文军¹, 刘 敏¹, 赵强元¹

(1. 中国人民解放军海军总医院检验科, 北京 100048; 2. 河北省北方医学院

2009 级医学检验系, 河北张家口市 075000)

摘要:目的 了解再生障碍性贫血、急性淋巴细胞白血病及髓系白血病患者 EB 病毒(EBV)和人巨细胞病毒(HCMV)核酸检测阳性率与其年龄的关系。方法 收集中国人民解放军海军总医院 2012 年 1 月至 2013 年 12 月骨髓穿刺后临床确诊为再生障碍性贫血、急性淋巴细胞白血病及髓系白血病患者为研究对象,采用达安基因核酸检测试剂盒对 EBV 和 HCMV 核酸进行检测,分析 EBV 和 HCMV 感染阳性率与患者年龄的关系。结果 EBV 和 HCMV 在 3 种血液病中核酸检测阳性率不同,HCMV 核酸检测阳性检出率(15.8%)低于 EBV(43.7%)。再生障碍性贫血和髓系白血病患者中,不同年龄患者 EBV 核酸检测阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.01$)。结论 对于儿童再生障碍性贫血病和髓系白血病患者应更加重视 EBV 和 HCMV 核酸的监测。

关键词:EB 病毒; 人巨细胞病毒; 白血病; 基因检测**DOI:**10.3969/j.issn.1673-4130.2015.07.009**文献标识码:**A**文章编号:**1673-4130(2015)07-0885-03**Relationship between positive rate of EBV and HCMV testing with patients' age in 179 cases of leukemia***Chen Changguo¹, Guo Jianwei¹, Du Qing^{1,2}, Li Wenjun¹, Liu Min¹, Zhao Qiangyuan¹

(1. Department of Clinical Laboratory, Navy General Hospital of PLA, Beijing 100048, China; 2. Grade 2008,

Department of Clinical Laboratory, Hebei Provincial North Medical College, Zhangjiakou, Hebei 075000, China)

Abstract: Objective To understand the relationship between the positive rate of Epstein-Barr virus (EBV) and human cytomegalovirus (HCMV) nucleic acid detection with the age in the patients with aplastic anemia, acute lymphoblastic leukemia and myeloid leukemia. **Methods** The patients clinically diagnosed as aplastic anemia, acute lymphoblastic leukemia, and myeloid leukemia after bone marrow puncture in the Navy General Hospital from January 2012 to December 2013 were collected as the research subjects. the nucleic acid test kit from DAAN Gene Company was adopted for conducting the EBV and HCMV nucleic acid testing and analyzing the relationship between the positive rate of the EBV and HCMV infection with the patient's age. **Results** There were different testing positive rate among 3 kinds of hematonosis. As a whole, the positive rate of HCMV was lower than that of EBV (15.8% vs. 43.7%). The EBV nucleic acid detection positive rate had statistically significant difference among different ages of patients with aplastic anemia and myeloid leukemia. ($P < 0.01$). **Conclusion** For children patients with aplastic anemia disease and myeloid leukemia, more attention should be paid to monitoring of EBV and HCMV nucleic acid.

Key words: Epstein-Barr virus; human cytomegalovirus; leukemia; gene testing

EB 病毒(EBV)和人巨细胞病毒(HCMV)均为人类疱疹病毒,在人群中广泛感染,特别是在免疫功能低下的人群中可出现显性感染或激活再次感染从而造成严重伤害^[1-3]。血液病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测对于其合理用药、病情监测、临床分期及预后和放疗后复发的监测等有重要的意义,而关于血液病患者外周血中 EBV 和 HCMV 核酸检测情况与患者年龄关系的研究少有报道,现将 2012 年 1 月至 2013 年 12 月本院血液科和儿科不同年龄段再生障碍性贫血、急性淋巴细胞白血病及髓系白血病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测情况报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2012 年 1 月至 2013 年 12 月在本院血液科和儿科骨髓穿刺后临床诊断为再生障碍性贫血患者 65 例、急性淋巴细胞白血病患者 62 例、髓系白血病患者 62 例,共 179 例(剔除重复检测的病例)。179 例患者中男 106 例,<18 岁 48 例,≥18 岁 58 例;女 73 例,<18 岁 42 例,≥18 岁 31 例。

1.2 仪器与试剂 EBV 和 HCMV 荧光定量检测试剂盒购自中山大学达安基因股份有限公司,其中包括 Taq 酶、反应液

(反应液中含有 EBV 或 HCMV 特异性荧光探针)、dNTP 等; 血浆及全血标本来自于日常临床送检 EDTA-Na₂+抗凝全血标本。荧光定量 PCR 仪为 ABI 公司 StepOne 产品。判定标准以 EBV 和 HCMV 核酸检测水平大于 1 000 IU/mL 为阳性。

1.3 核酸提取 取 2 支试管分别加入 1 mL 生理盐水和淋巴细胞分离液,取 1 mL 全血加入到 1 mL 生理盐水中混匀,将稀释后的全血轻柔地加入到 1 mL 淋巴细胞分离液上层,2 200 r/min 室温离心 10 min,用一次性吸管小心吸取中间的白膜层加入到 1.5 mL EP 管中,8 000 r/min 离心 5 min,弃上清液,在沉淀中加入 50 μL DNA 裂解液,振荡混匀,100 ℃ 金属浴 10 min,13 000 r/min 离心 5 min,上清液即为 DNA 模板。

1.4 PCR 反应体系及条件 采用 Axygen 公司生产的 8 联排荧光定量 PCR 管,依次加入反应液 40 μL,普通耐热 Taq 酶 3 μL,核酸模板 2 μL,在涡旋振荡器上振荡均匀后在专用小离心机上短时间离心 15 s。PCR 反应条件为 93 ℃ 2 min; 93 ℃ 45 s, 55 ℃ 60 s, 10 个循环; 93 ℃ 30 s, 55 ℃ 45 s, 40 个循环; 收集荧光。

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81401311);首都特色临床应用研究(2141107006614009);院内创新培育基金(XPY201412)。

作者简介:陈昌国,男,主管技师,主要从事分子免疫相关研究。

1.5 统计学处理 采用 SAS 9.2 版软件进行统计学分析, 计数资料以百分率表示, 组间比较采用 χ^2 检验; EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率与年龄的关系采用 Logistic 回归分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 血液病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率 EBV 核酸检测阳性率(43.7%)大于 HCMV 核酸检测阳性率(20.7%)。不同年龄患者 EBV 核酸检测阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 而不同年龄患者 HCMV 核酸检测阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 1。

表 1 血液病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率[n=179,n(%)]

年龄(岁)	n	EBV	HCMV
<18	87	38(43.7)	12(13.8)
≥18	92	19(20.7)	5(5.4)

2.2 再生障碍性贫血患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率

再生障碍性贫血患者中, 不同年龄患者 EBV 核酸检测阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 而不同年龄患者 HCMV 核酸检测阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 2。

表 2 再生障碍性贫血患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率[n=65,n(%)]

年龄(岁)	n	EBV	HCMV
<18	36	15(41.7)	5(13.9)
≥18	19	3(15.8)	1(5.2)

2.3 急性淋巴细胞白血病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率 急性淋巴细胞白血病患者中, 不同年龄患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 3。

表 3 急性淋巴细胞白血病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率[n=62,n(%)]

年龄(岁)	n	EBV	HCMV
<18	34	13(38.2)	4(11.8)
≥18	28	7(25.0)	3(10.7)

2.4 髓系白血病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率 髓系白血病患者中, 不同年龄患者 EBV 核酸检测阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 而不同年龄患者 HCMV 核酸检测阳性率差异无统计学意义($P > 0.05$), 见表 4。

表 4 髓系白血病患者 EBV 和 HCMV 核酸检测阳性率[n=62,n(%)]

年龄(岁)	n	EBV	HCMV
<18	17	10(58.8)	3(17.6)
≥18	45	9(20.0)	1(2.2)

3 讨 论

EBV 又被称为人类 4 型疱疹病毒(HHV-4), 是人群中广泛感染的病毒种类之一, 在宿主细胞内主要以潜伏期和裂解期 2 种形式存在^[2]。研究表明, 90%~95% 以上成年人体内 EBV 抗体(EBV-VCA IgG、EBV-MA IgG 等) 阳性, 这些抗体

具有保护作用, 可避免再次感染同种病毒^[4-5]。婴儿是 EBV 的易感人群, 但大多数感染患儿无症状或仅有不易被察觉的轻微症状, 其中有 35%~55% 的患者可发生传染性单核细胞增多症^[6]。尽管大量的 EBV 可被免疫系统清除, 但潜伏在体内的少量病毒能够在机体静息 B 淋巴细胞中建立起一种长期的潜伏感染状态成为导致多种严重疾病的罪魁祸首。

血液病患者因基础疾病的存在和长期住院治疗等因素, 机体免疫状态较健康人群低, 容易发生 EBV 感染。近年的研究证实, EBV 感染与多种血液病的发生、发展及预后关系密切, 并能加剧病情的恶化或增加治疗的难度。EBV 大量复制可导致机体免疫功能异常, 使血液系统疾病(如急性白血病、再生障碍性贫血)发病率增高。本研究中再生障碍性贫血、急性淋巴细胞白血病、及髓系白血病患者 EBV 核酸检测阳性率不同。Gupta 等^[7]对 185 例小于 18 岁的再生障碍性贫血患者进行检测, 发现 EBV 核酸检测阳性率为 20%, 而本研究中, 小于 18 岁的再生障碍性贫血患者的 EBV 核酸检测阳性率为 41.7%, 大于或等于 18 岁患者 EBV 核酸检测阳性率为 15.8%。本研究中急性淋巴细胞白血病和髓系白血病患者 EBV 核酸检测阳性率分别为 38.2% 和 58.8%, 而 Ahmed 等^[8]关于这 2 种血液病患者 EBV 核酸检测阳性率为 31.7%, 其中髓系白血病患者 EBV 核酸检测阳性率偏高, 可能与入组的样本数量及患者的病程有关。

HCMV 是导致各种先天畸形及引起免疫缺陷个体严重感染的重要病原体。HCMV 感染和大量复制可通过抑制造血细胞增殖和分化、损伤骨髓基质细胞导致造血因子网络紊乱、介导自身抗体的产生引起贫血及血小板减少、直接破坏红细胞等机制引起造血功能紊乱^[9-10]。机体一旦感染巨细胞病毒, 将长期或终身携带病毒^[11], 人类感染 HCMV 后多表现为无症状的潜伏感染, 免疫功能低下的人群(如器官移植、免疫抑制患者、新生儿等)可出现显性感染或激活再次感染, 杨海青等^[12]的研究指出 HCMV 活化状态与机体免疫系统的下降呈正相关。本研究中再生障碍性贫血、急性淋巴细胞白血病、及髓系白血病患者 HCMV 核酸的阳性率均低于 EBV, 其中小于 18 岁的髓系白血病患者的阳性率最高为 17.6%。

血液病的发生、发展及临床治疗和预后与患者的免疫状态有密切的联系。研究表明, 免疫功能低下者白血病发病率明显高于健康人群, 一旦发生白血病可使机体的免疫功能进一步受损, 减弱了免疫系统对肿瘤细胞的免疫监视和机体的抗感染能力, 此时一些病毒便会出现活化和激活, 进一步加重病情。本研究发现再生障碍性贫血和髓系白血病患者中, 不同年龄患者 EBV 核酸检测阳性率比较差异有统计学意义($P < 0.01$), 提示在这 2 种血液病患者应更加重视 EBV 核酸的检测。

参 考 文 献

- Crough T, Khanna R. Immunobiology of human cytomegalovirus: from bench to bedside[J]. Clin Microbiol Rev, 2009, 22(1): 76-98.
- Thorley-Lawson, JB Hawkins, SI Tracy, et al. The pathogenesis of Epstein-Barr virus persistent infection[J]. Curr Opin Virol, 2013, 3(3): 227-232.
- Thorley-Lawson, MJ Allday. The curious case of the tumour virus: 50 years of Burkitt's lymphoma[J]. Nat Rev Microbiol, 2008, 6(12): 913-924.
- Thorley-Lawson DA, Duca KA. Epstein-Barr virus: a paradigm for persistent infection-for real and in virtual reality[J]. (下转第 888 页)

表 2 两组患者 APACHE II 评分和 PCT 的动态变化

组别	n	治疗第 1 天	治疗第 5 天	治疗第 10 天	治疗结束前
存活组	28				
APACHE II		35.62±4.33	20.60±3.31*	15.60±2.31*	6.60±1.23*
PCT		1.70±0.40	1.40±0.31*	1.00±0.28*	0.61±0.16*
死亡组	20				
APACHE II		39.60±5.11	45.60±4.30	52.60±3.75	61.60±2.80
PCT		1.80±0.42	2.20±0.62	3.20±0.71	4.40±0.42

*: $P < 0.05$, 与死亡组比较。

2 讨 论

AP 是一种临幊上严重的急性炎症,2012 年对急性胰腺炎亚特兰大分类和定义进行了修改,按照严重程度分为轻症、中症和重症,目前临幊常用的诊断方法仍然是影像学和实验室检查,但是敏感性较差,对病情的发展和评估价值有限^[3];由于重症胰腺炎患者临幊表现不一,变化很快,急性胰腺炎评价系统如 Ranson 评分、CT 分级、APACHE II 评分、MODS 评分等对病情的发展和预后评估也有一定的局限性^[4]。因此,寻找更好的血清学指标并结合 APACHE II 评分,以期待在病情的发展和预后的评估中起到更为重要的作用。

PCT 由甲状腺的 C 细胞产生的一种性质稳定的蛋白质,是人类降钙素的前体分子,无激素活性。健康人 PCT 的浓度很低,而在细菌毒素和炎性因子的刺激下有明显的升高,血清中的 PCT 水平能反映系统炎性反应的程度^[5]。在严重细菌感染、脓毒症和多器官功能衰竭时,PCT 水平的变化更为明显,可以反映疾病的严重程度^[6]。Mofidi 等^[7]对胰腺炎患者在病情发展过程中对其动态检测 PCT 时也发现,随着病情的加重,PCT 也有一定程度的升高。本文的研究揭示 PCT 对死亡有较高的预测价值,检测血清 PCT 的浓度可作为 SAP 患者是否会致死的预测指标。

APACHE II 评分综合了急性生理和慢性健康状况等因素,用于评估重症患者的严重程度,目前也应用于急性胰腺炎患者病情的评估^[8]。APACHE II 评分目前应用于国内外危重患者病情评估最广泛的评分系统,它可以客观地反映病情的实时状况,了解治疗效果,指导医生的治疗。本文的研究显示,患者入院第 2 天的 APACHE II 评分在存活组和死亡组之间差异无统计学意义($P > 0.05$),随着治疗时间的延长,存活组病情得到缓解,APACHE II 评分和 PCT 浓度进行性下降,而在死亡组中,APACHE II 评分和 PCT 浓度则进行性升高,并且 APACHE II 评分和 PCT 浓度越高,死亡的风险也越高。

APACHE II 评分比较直观,但也有主观判断因素,而

PCT 测定方法可靠,结果也容易进行比较,Ammori 等^[9]也认为 PCT 比 APACHE II 评分更能预测 SAP 患者的预后。综上所述,PCT 检测快速方便,与临幊感染的严重程度密切相关,能够更早对 SAP 患者的预后进行研判,有利于医疗小组采取更切实有效的治疗方法,提高重症胰腺炎患者治疗的成功率,更好地为患者服务。

参考文献

- Vege SS, Gardner TB, Chari ST, et al. Low mortality and high morbidity in severe acute pancreatitis without organ failure:a case for revising the Atlanta classification to include "moderately severe acute pancreatitis" [J]. Am J Gastroenterol, 2009, 104(3): 710-715.
- Bezmarevic M, Mirkovic D, Soldatovic I, et al. Correlation between procalcitonin and intra-abdominal pressure and their role in prediction of the severity of acute pancreatitis [J]. Pancreatology, 2012, 12(4): 337-143.
- 李振方,赵琦,徐昌青,等.急性胰腺炎 CT 检查时机选择[J].胃肠病学和肝病学杂志,2011,(1):86-87.
- Wu BU, Johannes RS, Sun X, et al. The early prediction of mortality in acute pancreatitis:a large population-based study [J]. Gut, 2008, 57(12): 1698-703.
- 杜翠霞.血清降钙素原和 C 反应蛋白水平在感染性疾病中的诊断价值[J].实用心脑血管病杂志,2012,8(12):1366-1367.
- Bezmarevic M, Mirkovic D, Soldatovic I, et al. Correlation between procalcitonin and intra-abdominal pressure and their role in prediction of the severity of acute pancreatitis [J]. Pancreatology, 2012, 12(4): 337-343.
- Mofidi R, Suttie SA, Patil PV, et al. The value of procalcitonin at predicting the severity of acute pancreatitis and development of infected pancreatic necrosis: systematic review [J]. Surgery, 2009, 146(1): 72-81.
- Papachristou GI, Muddana V, Yadav D, et al. Comparison of BISAP, Ranson's, APACHE-II, and CTSI scores in predicting organ failure, complications, and mortality in acute pancreatitis [J]. Am J Gastroenterol, 2010, 105(2): 435-442.
- Ammori Z, Gulbinas A, Pundzius J, et al. Value of the different prognostic systems and biological markers for predicting severity and progression of acute pancreatitis [J]. Scand J Gastroenterol, 2010, 45(7-8): 959-960.

(收稿日期:2014-11-20)

(上接第 886 页)

- Trends Immunol, 2008, 29(2):195-201.
- Fachiroh J, Paramita B Hariyanto. Single-assay combination of Epstein-Barr Virus (EBV) EBNA-1 and viral capsid antigen-p18-derived synthetic peptides for measuring anti-EBV immunoglobulin G (IgG) and IgA antibody levels in sera from nasopharyngeal carcinoma patients: options for field screening [J]. J Clin Microbiol, 2006, 44(14):1459-1467.
 - Macsween K, Crawford H. Epstein-Barr virus recent advances [J]. Lancet Infect Dis, 2003, 3(1):131-133.
 - Gupta VR, Pratap AK. Epidemiological Features of Aplastic Anemia in Indian Children [J]. Indian J Pediatr, 2013, 81(3):257-259.
 - Ahmed HG, Osman M, Ashkanyty. Incidence of Epstein-Barr virus in pediatric leukemia in the Sudan [J]. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2012, 12(2):127-131.
 - 刘小宁,衡春,李元媛.60 例小儿巨细胞病毒感染的血液学检测分析 [J].中华医院感染学杂志,2012,22(4):733-734.
 - 郑琪,陶然,尚世强.人巨细胞病毒博弈宿主免疫进展 [J].病毒学报,2013,29(1):85-91.
 - Sinclair JH, Reeves MB. Human cytomegalovirus manipulation of latently infected cells [J]. Viruses, 2013, 5(11):2803-2805.
 - 杨海青,朱剑梅,杨忠银,等.不同血液病患者巨细胞病毒抗体滴度比较 [J].成都医学院学报,2013,8(1):89-91

(收稿日期:2014-11-10)