

论著·临床研究

传染性单核细胞增多症患者不同标本 EBV-DNA 检测的临床价值

陈世知, 谢运兰, 梅严花, 庄稚佳

(重庆医科大学附属第二医院检验科分子诊断中心, 重庆 400010)

摘要:**目的** 探讨血浆、外周血单个核细胞(PBMC)、咽拭子的 EBV-DNA 载量对 16 岁以上传染性单核细胞增多症(IM)患者的诊断价值。**方法** 回顾性分析 130 例 16 岁以上疑似 IM 患者血浆、PBMC 和咽拭子 3 种标本 EBV-DNA 载量检查结果。**结果** 61 例临床和实验室确诊 IM 中, 血浆标本检出 16 例, EBV-DNA 检出率为 26.22%; 31 例检测 PBMC 的患者 EBV-DNA 检出率为 61.29%; 37 例咽拭子 EBV-DNA 检出率为 83.78%。血浆、PBMC、咽拭子以一项或多项阳性为依据的联合检测, EBV-DNA 检出率 100.00%。**结论** 通过血浆、PBMC、咽拭子 EBV-DNA 的联合检测可提高 16 岁以上 IM 阳性检出率, 为临床提供更多的病原学诊断和治疗依据。

关键词: 传染性单核细胞增多症; 血浆; 外周血单个核细胞; 咽拭子
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.02.015 **中图法分类号:**R725.1
文章编号:1673-4130(2018)02-0176-04 **文献标识码:**A

Clinical value of different samples of EBV-DNA detection in patients with infectious mononucleosis

CHEN Shizhi, XIE Yunlan, MEI Yanhua, ZHUANG Zhijia

(Molecular Diagnostic Center, Department of Clinical Laboratory, Second Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract:**Objective** To investigate the diagnostic value of plasma, peripheral blood mononuclear cell(PBMC) and throat swab EB virus(SBV) load in the patients with infectious mononucleosis(IM) aged over 16 years old.**Methods** The detection results in 130 patients with suspected IM aged over 16 years old of 3 different samples of plasma, peripheral blood mononuclear cell(PBMC) and throat swab EB virus(SBV) load were analyzed retrospectively.**Results** Among 61 cases of IM verified by clinic and laboratory, 16 cases of IM were detected by plasma sample, the detection rate of EBV-DNA was 26.22%; in 31 cases of PBMC detection, the EBV-DNA detection rate was 61.29%; in 31 cases of throat swab detection, the EBV-DNA detection rate was 83.78%. The EBV-DNA detection rate of the combined detection with one indicator or multiple indicators positive of plasma, PBMC and throat swab as the basis was 100.00%.**Conclusion** The combined detection of plasma, PBMC and throat swab can improve the positive rate in the patients with IM aged over 16 years old, which can provide more bases for pathogenic diagnosis and treatment for clinic.

Key words: infectious mononucleosis; plasma; peripheral blood mononuclear cell; throat swab

传染性单核细胞增多症(IM)是由 EB 病毒(EBV)引起的急性感染性疾病,有发热、咽峡炎、淋巴结肿大、肝脾肿大、肝功损害、皮疹等临床特点,儿童多见,我国 3~5 岁儿童 EBV 有一定自限性,成人 IM 绝大多数有高热,可持续 2~3 周,以多系统损害为主,绝大多数除有上述症状外,可并发间质性肺炎、肝炎、心肌炎或胃肠道出血等,皮疹分布在躯干缺乏特异性表现,数目较少,一般在病程 1 周以后出现,易误诊为药疹,症状与体征的多样性和不典型性使临床误诊率较高^[1]。传统的实验室诊断检测方法变异范围大,难以实时反映 EBV 存

在的真实情况。随着荧光定量聚合酶链反应的普及,病毒核酸的检测以其采样方便,检测方法简单、快速、灵敏、可靠的特点在临床上广泛应用,为病毒感染性疾病的诊断治疗提供了可靠的病原学依据,同时也提高诊断的准确率^[2-3]。研究者通过回顾性分析 130 例 16 岁以上疑似 IM 患者血浆、外周血淋巴细胞(PBMC)及咽拭子标本 EBV-DNA 的载量,以评价不同标本类型检测结果的临床价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 4 月至 2016 年 9 月重

作者简介:陈世知,女,副主任技师,主要从事临床分子诊断工作研究。
本文引用格式:陈世知,谢运兰,梅严花,等. 传染性单核细胞增多症患者不同标本 EBV-DNA 检测的临床价值[J]. 国际检验医学杂志, 2018, 39(2):176-178.

庆医科大学附属第二医院住院收治临床确诊 IM 病例 61 例(病例组),男 32 例,女 29 例,年龄 16~59 岁,非 EBV 感染相关疾病 69 例(对照组),男 34 例,女 35 例,年龄 16~61 岁。病例组和对对照组间性别和年龄比较差异无统计学意义($P>0.05$)。诊断标准:(1)具有典型临床表现和体征,如发热、咽峡炎、淋巴结肿大、肝脾肿大、皮疹等;(2)外周血常规变异淋巴细胞大于 10%;(3) EBV 衣壳抗原 IgM(EBV-VCA-IgM)阳性。(1)中任何 3 项且同时具备(2)、(3)中的任一项即可诊断^[3]。

1.2 方法

1.2.1 标本采集 患者均于清晨空腹采集静脉乙二胺四乙酸(EDTA)抗凝血 2 mL,用天津灏洋人淋巴细胞分离液分离 PBMC,离心分离血浆,咽拭子(尽量多的采集两侧腭弓、咽部及扁桃体上的上皮细胞和分泌物)用 1 mL 生理盐水洗脱,离心取沉淀,再次用生理盐水洗涤离心,取沉淀-20 ℃保存待检。

1.2.2 DNA 提取 采用北京鑫诺美迪 EBV 核酸定量检测试剂盒,提取方法按试剂盒说明书进行。

1.2.3 荧光定量聚合酶链反应 按上述试剂盒扩增,包括阳性标准品、临界阳质控品、阴性对照品,阳性对照品,以 EBV 基因组 BamH1W 基因(EBV 复制特异基因)设计特异性引物和探针^[4-6],荧光探针序列为 FP5'-TGT CTT GGC CCT GAT CCT GAG-3'。引物序列为 F5'-CGG CAG TGG ACC TCA AAG AAG-3',P5'-AGG ACG AGG ACG AGG AGG CGG AAG A-3'。扩增条件:尿嘧啶-DNA 糖基化酶反应 37 ℃ 2 min, 95 ℃ 3 min 预变性,然后 94 ℃ 15 s→60 ℃ 35 s 共 40 个循环,最后 25 ℃ 1 min。样本 DNA 核酸纯化之后,使用百乐 CFX96 荧光定量聚合酶链反应仪定量检测各样本的 EB-DNA 拷贝数,检测

步骤、结果判断,以及质控方法按试剂盒说明。该试剂盒灵敏度为 1.0×10^2 copies/mL,结果判断:定量结果大于 500 copies/mL 为检出。

1.3 统计学处理 采用 SPSS22.0 软件进行统计分析,计量资料组间比较采用 t 检验,率的比较采用 χ^2 检验。检验水准 $\alpha=0.05$, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两组 EBV-DNA 检出率比较 病例组血浆 EBV-DNA 检出率为 26.22%,PBMC EBV-DNA 检出率为 61.29%,咽拭子 EBV-DNA 检出率为 83.78%,以其中任意一项阳性为阳性判断标准的联合检测 EBV-DNA 检出率为 100.00%。对照组血浆 EBV-DNA 检出率为 0.00%、PBMC EBV-DNA 检出率为 2.22%、咽拭子 EBV-DNA 检出率为 0.00%、联合检测 EBV-DNA 检出率为 2.22%,见表 1。

2.2 不同标本的 EBV-DNA 平均浓度比较 血浆标本 EBV-DNA 平均浓度为 $(3.97\pm1.53)\times10^4$ copies/mL、PMBC 标本 EBV-DNA 平均浓度为 $(5.70\pm1.42)\times10^4$ copies/mL、咽拭子标本 EBV-DNA 平均浓度为 $(5.30\pm1.37)\times10^6$ copies/mL。

2.3 3 种标本在 IM 不同并发症中 EBV-DNA 检出率比较 非嗜肝病毒性肝炎的血浆、PBMC、咽拭子及联合检测 EBV-DNA 检出率分别为 25.00%、66.67%、83.33%、100.00%,其他标本的 EBV-DNA 检出率见表 2。血浆 EBV-DNA 检出率与咽拭子标本比较差异有统计学意义($P<0.05$);PBMC 与咽拭子标本 EBV-DNA 检出率比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。3 种类型标本联合检测 EBV-DNA 检出率分别与血浆、PBMC 比较差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 1 两组临床标本的 EBV-DNA 检出率比较

组别	血浆			PBMC			咽拭子			联合检测		
	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)
病例组	61	16	26.22	31	19	61.29	37	31	83.78	31	31	100.00
对照组	69	0	0.00	45	1	2.22	45	0	0.00	45	1	2.22

表 2 3 种标本在 IM 不同并发症中 EBV-DNA 检出率比较

并发症	血浆			PBMC			咽拭子			联合检测		
	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)	总例数 (<i>n</i>)	检出数 (<i>n</i>)	检出率 (%)
非嗜肝病毒性肝炎	16	4	25.0	6	4	66.67	6	5	83.33	6	6	100.00
嗜血细胞综合征	4	2	50.0	0	0	0.00	0	0	0.00	4	2	50.00
肺炎	4	2	50.0	0	0	0.00	0	0	0.00	4	2	50.00

3 讨 论

EBV 属于 γ -疱疹病毒亚科淋巴潜隐病毒属双链 DNA 病毒,嗜淋巴细胞性,又名人类疱疹病毒 4 型。EBV 感染时 DNA 可呈线性并复制,宿主细胞裂解,引起特异性细胞毒 T 淋巴细胞(CTL)的免疫应答,CTL 的免疫应答为 EBV 感染后临床症状的主要原因,也可以为潜伏状态,病毒基因组两端的末端重复序列相互连接形成环状游离体,病毒 DNA 环化后,迅速进入潜伏期,并随宿主细胞复制而复制,在机体免疫功能降低或使用免疫抑制药物的情况下再发感染;少数情况下,出现缺损性感染,在感染细胞中可以发现不完整的病毒基因组,并能够利用细胞间的传递方式进行扩散。EBV 主要感染口咽部上皮细胞和 B 淋巴细胞,也可引起肺炎、非嗜肝病毒性肝炎,严重的可引起嗜血细胞综合征。对免疫缺陷者可感染 T 淋巴细胞、平滑肌细胞等。通过唾液、飞沫、输血传播等方式传播,其中接吻是主要的传播方式。

成人 IM 初期症状与普通病毒感冒症状差异不大,由于患者的免疫功能、自觉症状与耐受程度不一样,患者初次就诊的时间上存在较大的差异。临床上 EBV-DNA 检出率各不相同^[7-9]。本研究发现,IM 的整个进程中咽拭子的 EBV-DNA 拷贝数检出率较高,检出率为 83.33%,虽然慢性持续性 EBV 感染病例咽拭子也可检出,但拷贝数相对较低^[10]。外周血 EBV-DNA 检出率为 26.22%与于谨铭等^[11]研究结果相同。咽拭子的 EBV-DNA 检出率明显高于血浆,结果与陈晓宇等^[7]报道一致。这与 EBV 首先侵入口咽部上皮细胞、唾液腺的管状上皮和扁桃体隐窝,并不断增殖浸润有关。PBMC 的 EBV-DNA 检出率 66.67%高于血浆,结果与杨柳等^[8]研究结果一致。可能与局部细胞裂解释放的 EBV 颗粒感染上皮细胞下循环内的 B 淋巴细胞,感染的 B 淋巴细胞随后进入全身血流和整个淋巴网状系统相关。

发生嗜血细胞综合征和 EBV 引起的非嗜肝病毒性肝炎的患者血浆的 EBV-DNA 检出率为 50.00%,比未发生的患者高。可能与这些患者的感染细胞裂解的程度比未发生者严重,病毒释放入血较多有关。3 种类型标本联合检测对于 EBV 感染引起的非嗜肝病毒性肝炎的 EBV-DNA 检出率达到 100.00%。建议不明原因的肝炎患者同时送检 3 种类型标本以明确是否 EBV 感染导致。由于标本量的限制,EBV 引起的肺炎和嗜血细胞综合征因未送检咽拭子和淋巴细胞导致联合检测的 EBV-DNA 检出率为 50.00%。陈晓宇等^[7]研究显示,EBV 感染咽拭子的阳性率为 51.60%,提示不明原因的成人肺炎患者检测咽拭子 EBV 的诊治价值。

EBV 感染引起的病毒血症与机体的免疫状态、病

毒的复制及感染局部细胞裂解的状态相关,对感染 1~2 周后就诊的患者,由于不同个体产生的病毒抗体量的不同,对病毒的中和能力不同,血浆的 EBV-DNA 检出率相对低很多,淋巴细胞和咽拭子标本中 EBV-DNA 检出率明显高于血浆。研究结果提示,IM 局部感染的状态与淋巴细胞的感染状态密切相关。联合检测的 EBV-DNA 检出率分别与血浆、PBMC 比较差异有统计学意义($P < 0.05$),提示联合检测提高病毒的检出率及诊断的准确率。根据血清学调查,由于机体免疫功能的差异,咽部和淋巴细胞的 EBV 存在时间长短不一,对 IM 恢复期血清 EBV-DNA 低或阴性的患者选择咽拭子或淋巴细胞 EBV-DNA 检测,联合 EBV 抗体的检测结果及临床症状来提高诊断准确率更为重要^[12]。

根据 EBV 的感染途径及生活史,同时采集血浆、PBMC 和咽部的上皮细胞样本,不仅提高了 IM 的 EBV-DNA 检出率及 IM 诊断的准确率,而且对感染的时期、预后及其他 EBV 感染相关疾病的诊断和治疗方式的选择提供依据。目前国内外文献检索对 EBV-DNA 检测的方法中 3 种联合检测的临床意义未见报道。由于实验方法学及病例选择、入组和排除标准、仪器及检测方法、样本类型、EBV-DNA 基因片段选择的不同,研究结果的报道不一。研究者发现 EBV-DNA 复制相关基因检测能为 IM 的诊断治疗提供了实时的病原学证据,结合血清的抗体结果可为临床诊治提供依据。这 3 种标本采集方便、操作较为简单、费时不多、结果准确可靠,临床医生和患者易于接受。由于本研究标本量的限制,希望以后能进一步深入研究。

参考文献

- [1] 陆晓茜,高举.慢性活动性 EBV 感染诊治进展[J].中国小儿血液与肿瘤杂志,2013,18(5):198-213.
- [2] 李金明.实时荧光 PCR 技术[J].北京:人民军医出版社,2007:291-298.
- [3] 邓晓凤.成人传染性单核细胞增多症 44 例临床分析[J].四川医学,2011,32(12):1931-1933.
- [4] QIU J, LAWSON D A. EBV microRNA BART 18-5p targets MAP3K2 to facilitate persistence in vivo by inhibiting viral replication in B cells[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014, 111(30):11157-11162.
- [5] HUTAJULU S H, KURNIANDA J, TAN I B, et al. Therapeutic implications of Epstein-Barr virus infection for the treatment of nasopharyngeal carcinoma[J]. Therap Clin Ris Man, 2014, 10(1):721-736.
- [6] NOWAG H, GUHL B, THRIENE K, et al. Macroautophagy proteins assist epstein barr virus production and get incorporated into the virus particles[J]. (下转第 181 页)

已成为临床检测 CMV 感染的一线检测方法。

由于 FQ-PCR 对于标本类型、提取方法等没有统一的标准,以致有可能出现患者在同一时期不同实验室的结果,不具可比性或者同一实验室由于标本类型不同导致结果存在明显差异的现象。因此,为保证结果的一致性和可比性,研究者做了这方面的分析。

本研究选择了 52 例高度怀疑 CMV 感染的患者,同时收集其血清、血浆、全血和 PBMC 类型的标本,平行检测。为了保证结果的可比性,统一使用了离心柱提取的做法。本研究结果提示, PBMC 的 CMV-DNA 检出率与病毒载量水平均较其他标本类型高,这与沈丹等^[8]在国内的报道一致。Bland-Altman 分析提示在 95%一致限可信区间内 PBMC 与血清、全血和血浆间病毒载量差值的绝对值最大为 2.34。这种差异会对 CMV 感染的临床诊疗与监测带来明显影响。所以在临床 CMV-DNA 血液学感染诊断中,研究者认为分离 PBMC 能有效提高病毒浓度,可以较好地发现早期 CMV 感染,能预防性地对 CMV 感染危险因素的患者进行治疗,达到早期治疗潜伏性 CMV 感染的目的。

对于尿液标本,本研究选择了 85 例高度怀疑 CMV 感染患者的标本,按照临床上常用的类型,分为混合尿、尿沉渣和尿上清,同样采用离心柱的方法提取 DNA。结果显示,混合尿和尿沉渣具有较高的检出率,混合尿的 CMV-DNA 载量最高;Bland-Altman 分析提示不同类型尿液标本间病毒载量差值最大绝对值为 1.66。故在 CMV-DNA 载量水平动态监测方面考虑选择混合尿有更好的优越性,也提示尿上清中有一定的 CMV-DNA 拷贝数,采用尿沉渣作为临床 CMV 检测标本,可能会存在一定的漏诊率。另外有研究者发现肾脏有间歇性排巨细胞病毒颗粒的特性,所以在用尿液作为 CMV 临床检测标本,应多次采集混合尿检测,以减少漏诊率^[9]。

CMV-DNA 的检测具有重要临床价值,然而由于目前血液或尿液标本 CMV-DNA 的检测没有统一的

前处理规范,标本类型的差异会影响病毒的检出率,同一患者不同类型标本的病毒载量水平也存在差异。因此需要对前处理的过程进行统一和规范,例如在结果报告中注明使用的试剂、提取方法和标本类型等,以保证可比性。

参考文献

[1] 俞苏蒙,叶晓波,邢云卿,等.新兵人群人巨细胞病毒感染的血清流行病学调查[J].现代预防医学,2010,37(20):3927-3928.

[2] 吕静娟,胡文胜,余坚,等.温州市区育龄妇女孕前巨细胞病毒感染现状调查[J].中国优生与遗传杂志,2011,32(2):100-101.

[3] 叶贝.儿童巨细胞病毒感染的研究进展[J].中国保健营养,2016,26(3):119-120.

[4] 陈兰兰,倪安平.免疫抑制患者巨细胞病毒感染的实验室检测及临床意义[J].中华检验医学杂志,2014,37(2):155-158.

[5] ZHAO P, MA D, XUE F, et al. Seroprevalence and risk factors of human cytomegalovirus infection in the eastern Chinese population[J]. Arch Virol, 2009, 154(4):561-564.

[6] SOLANA R, TARAZONA R, AIELLO A E, et al. CMV and Immunosenescence: from basics to clinics[J]. Immun Age, 2012, 9(1):1-9.

[7] 张莉,周健,魏旭东,等.不同方法检测同种异基因造血干细胞移植受者巨细胞病毒感染的探讨[J].中国实验血液学杂志,2007,15(3):558-562.

[8] 沈丹,黄少军,汪晶晶.三种标本 CMV-DNA 含量检测在儿童巨细胞病毒性肝炎诊断和治疗监测中的应用[J].肝脏,2015,20(1):35-37.

[9] AWADHI R, AIHARMI J, ALFADHLI S. Prevalence of cytomegalovirus DNA in cord blood and voided urine obtained from pregnant women at the end of pregnancy[J]. Med Princ Pract, 2012, 22(2):194-199.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)

(上接第 178 页)

Bio Med, 2014, 20(1):116-125.

[7] 陈晓宇,陈越,邓蕾.咽拭子和外周血 EB 病毒核酸检测结果分析[J].实验与检验医学,2015,20(1):70-72.

[8] 杨柳,孙颖,陈丹,等.外周血单个核细胞和血浆标本 EB 病毒 DNA 检测结果的比较[J].江苏医药,2015,6(3):693-694.

[9] 郭建巍. EB 病毒感染的核酸检测:标本类型的选择[J].分子诊断与治疗杂志,2016,8(3):145-149.

[10] 康喜讯,万世恒.鼻咽组织和外周血 EB 病毒 DNA 检测

用于早期诊断鼻咽癌[J].临床医学工程,2012,19(10):1697-1698.

[11] 于谨铭,罗兵. EBV-DNA 检测在儿童 EB 病毒感染中的临床意义[J].医学检验与临床,2012,23(5):1673-1675.

[12] 严海燕,罗晓红,陈娟,等. EB 病毒抗体和 DNA 联合检测可提高儿童传染性单核细胞增多症的诊断灵敏度[J].中国微生态学杂志,2011,23(6):540-542.

(收稿日期:2017-07-20 修回日期:2017-09-28)