

• 检验技术与方法 •

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

金 欣, 陈建魁[△], 于 农, 宋世平, 左向华, 许晓跃, 佟利威, 杨倩琳

(军事医学科学院附属医院检验科, 北京 100071)

摘要:目的 评价实时荧光定量聚合酶链反应对血液系统恶性肿瘤患者巨细胞病毒(CMV)感染和 EB 病毒(EBV)感染的早期诊断价值。方法 应用实时荧光定量 PCR 检测 334 例血液系统恶性肿瘤患者血液中 CMV DNA 和 EBV DNA 载量。结果 334 例患者中 EBV 检测阳性率为 13.2%, CMV 检测阳性率为 19.2%, DNA 拷贝数介于($10^2 \sim 10^7$) copy/mL 之间。治疗有效者 EBV DNA 和 CMV DNA 载量迅速下降, 2~3 周后转阴。结论 实时荧光定量 PCR 动态监测血液系统恶性肿瘤患者 CMV DNA 和 EBV DNA 水平对于 CMV 感染和 EBV 感染的早期诊断和疗效判断具有重要意义。

关键词:巨细胞病毒; 疱疹病毒 4 型; 人; 聚合酶链反应; 血液肿瘤

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.033

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0793-02

巨细胞病毒(cytomegalovirus, CMV)感染和 EB 病毒(epstein-barr virus, EBV)感染是威胁血液系统恶性肿瘤患者生存和影响临床疗效的重要并发症之一, 因此对这些患者进行分子水平的检测和监护显得越来越重要。国内外文献报道, CMV 感染引起的巨细胞病毒肺炎, 占移植后 CMV 病的 40%~60%, 致死率达 30%~90%^[1], 是移植后患者的主要感染并发症及死亡原因。EBV 是发现的第 1 个人类致癌病毒, 它与多种肿瘤的发生、发展有密切的联系, 被认为是免疫失调的触发点^[2]。因此, 选择快速、准确诊断 CMV 和 EBV 感染的方法在阻止感染进展和监测抗病毒疗效中起到越来越重要的作用。本研究应用荧光定量 PCR 方法检测血液系统恶性肿瘤患者与健康对照者 EBV DNA 和 CMV DNA 水平, 探讨 DNA 水平的动态变化与临床疗效的关系。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集 2008 年 9 月至 2010 年 2 月本院诊治的 334 例血液系统恶性肿瘤患者, 男 189 例, 女 145 例, (男:女 = 1.3:1), 中位年龄 35 岁(8~70 岁)。其中急性髓系白血病(AML)102 例; 急性淋巴细胞白血病(ALL)80 例; 慢性粒细胞白血病(CML)65 例; 骨髓增生异常综合征(MDS)25 例; 恶性淋巴瘤 25 例; 非霍奇金淋巴瘤(NHL)22 例; 再生障碍性贫血(AA)7 例; 霍奇金淋巴瘤 6 例; 嗜血细胞综合征 2 例。健康对照组 150 例来自健康体检人群, 各项体检指标均无明显异常。

1.2 标本处理 取 EDTA 抗凝静脉血 4 mL 送检, 血液标本用淋巴细胞分离液分离, 然后直接加 50 μ L DNA 提取液充分混匀, 沸水浴 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min, 离心半径 8 cm, 取上清液直接用于 PCR 检测或 -20 $^{\circ}$ C 冻存备用。

1.3 实时荧光定量 PCR 采用中山大学达安基因有限责任公司提供的 CMV 和 EBV 荧光定量试剂盒, 以及 Roche 公司 Light Cycler 扩增仪进行实时荧光定量 PCR, 其扩增条件为: 93 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 93 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 57 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 共 40 个循环, 37 $^{\circ}$ C 1 s。试剂盒提供的病毒阳性参考品($10^4 \sim 10^7$)以及阴性对照同时扩增, 得出所测样本中的核酸载量值, 用基因 copy/mL 表示。每次实验中, 阴性对照的 Ct 值(循环阈值)不显示任何数值, 阳性参考品的标准曲线的 r 值介于 -0.98~ -1.0, 检测下限为 500 copy/mL。

1.4 统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 计量资料的组间均值比较采用 t 检验。

2 结 果

2.1 外周血 CMV 和 EBV 检测结果 334 例血液系统恶性肿瘤患者中有 44 例患者 EBV 检测呈阳性, 阳性率 13.2%, 64 例 CMV 检测阳性, 阳性率 19.2%, 动态检测 DNA 拷贝数介于($10^2 \sim 10^7$) copy/mL 之间。25 例患者 EBV 和 CMV 检测同时呈阳性, 占 7.5%。

2.2 阳性病例分布 在 44 例 EBV 阳性患者中, AML 14 例, ALL 12 例, CML 5 例, NHL 4 例, 恶性淋巴瘤 3 例, 霍奇金淋巴瘤、MDS、AA 各 2 例。64 例 CMV 阳性患者中, AML 23 例, ALL 19 例, CML 12 例, NHL 2 例, 恶性淋巴瘤 3 例, 霍奇金淋巴瘤 1 例, MDS、AA 各 2 例。

2.3 荧光定量 PCR 动态监测与疗效的关系 在临床观察中, 有 18 例患者 CMV 检测连续阳性, 给予更昔洛韦治疗, 16 例患者均在 1~2 周后转阴, 但有 2 例患者在停药 2~3 周后复发。健康对照组中仅 2 例检测到数值, 且 DNA 拷贝数介于($10^2 \sim 10^3$) copy/mL 之间, 阳性率 1.3%, 其余均为阴性。恶性肿瘤组和健康对照组中的阳性率差异有统计学意义($P < 0.01$)。44 例 EBV 检测阳性患者中, 19 例患者 EBV DNA 在抗病毒治疗开始后迅速下降, 2~3 周后转阴。

3 讨 论

人巨细胞病毒属疱疹病毒科 β 亚科, 为双股线性 DNA 病毒。CMV 是免疫受损患者的重要病原体, 是血液系统恶性肿瘤患者的常见合并症, 也是导致患者死亡的主要原因之一。由于 CMV 原发感染可导致生命过程中长期潜伏感染, 免疫功能受损时, CMV 病最常表现的是 CMV 肺炎, 发生率约为 15%~20%, 其次是 CMV 胃炎, 发生率约为 10%, 如果不治疗 CMV 病的死亡率为 90% 左右^[3]。CMV 感染早期临床症状不明显, 主要依靠实验室诊断^[4]。传统的病毒分离与培养虽特异度高, 但敏感性差, 且对实验条件要求高, 一般实验室难以达到; 血清学检测虽简便快速, 但由于患者免疫功能受损难以产生抗体, 且无法提供现症感染资料。实时荧光定量 PCR 的发展为病毒感染诊断开辟了新途径^[5]。

EB 病毒属疱疹病毒, 具有长约 184 kb 的双链 DNA 结构, 内编码大于 85 个基因, 是第 1 个与人类肿瘤发生有明确联系的病毒。有研究表明^[6-7], EB 病毒与伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、MDS 等疾病相关, 大多数患者情况下免疫功能受损的淋巴瘤患者一旦合并 EB 病毒感染, 病情都会

[△] 通讯作者, E-mail: jinjin612@sina.com.

进行性发展,很难治疗。大多数患者移植后淋巴组织增殖性疾病都属于 B 细胞肿瘤,与 EB 病毒有一定的联系,通过实时荧光定量 PCR 方法可以检测到外周血中含有 EB 病毒载体。移植后淋巴组织增殖性疾病产生于骨髓移植受者的原因一般都在骨髓供者,因此对这些患者进行分子水平的检测和监护显得越来越重要。对于 EB 感染的治疗,目前临床上使用的抗 EB 病毒药物多为广谱的抗疱疹病毒和巨细胞病毒的药物,如更昔洛韦、阿昔洛韦、伐昔洛韦、西多福韦等,其缺点是无法影响由于免疫功能抑制导致的 EB 病毒致瘤作用。采用 EB 病毒特异性的细胞毒性 T 淋巴细胞(CTL)治疗可以克服这一缺点,同种异体造血干细胞移植后发生淋巴组织增生性疾病的患者是该治疗方法的最佳适应者^[8]。

本研究应用了实时荧光定量 PCR 方法,该方法不仅具有普通 PCR 的高灵敏性,而且由于运用了荧光探针可以通过光电转导系统直接探测 PCR 扩增过程中荧光信号的变化,真正实现了实时定量,克服了常规 PCR 反应不能定量以及易污染的问题。研究中通过实时荧光定量方法动态监测了血液系统恶性肿瘤患者 CMV DNA 和 EBV DNA 水平对于 CMV 感染和 EBV 感染的早期诊断和疗效判断具有重要意义。

参考文献

[1] Torres HA, Aguilera E, Safdar A, et al. Fatal cytomegalovirus pneumonia in patients with haematological malignancies: an au-

topsy-based case-control study[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14 (12):1160-1166.
 [2] Heller KN, Steinherz PG, Portlock CS, et al. EBV-positive lymphoma patients have a selective deficiency in EBV immunity[J]. J Clin Oncol, 2007, 25(18 Supp 1):21032.
 [3] 黄晓军,许兰平,任汉云,等. 异基因造血干细胞移植后巨细胞病毒及其危险因素分析[J]中华医学杂志, 2003, 83(9):766-769.
 [4] 万卓越. 病毒性疾病的诊断[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(6): 87-88.
 [5] Torres HA, Aguilera E, Safdar A, et al. Fatal cytomegalovirus pneumonia in patients with haematological malignancies: an autopsy-based case-control study[J]. Clin Microbiol Infect, 2008, 14 (12):1160-1166.
 [6] Heller KN, Steinherz PG, Portlock CS, et al. EBV-positive lymphoma patients have a selective deficiency in EBV immunity[J]. J Clin Oncol, 2009, 32(16):233-235.
 [7] Snow AL, Lambert SL, Natkunam Y, et al. EBV can protect latently infected B cell lymphomas from death receptor-induced apoptosis[J]. J Immunol, 2006, 177(5):3283-3293.
 [8] Gottschalk S, Heslop HE, Roon CM. Treatment of Epstein-Barr virus associated malignancies with specific T cells[J]. Adv Cancer Res, 2002, 84(9):175-201.

(收稿日期:2010-11-30)

• 检验技术与方法 •

血清胱抑素 C 检测在一氧化碳中毒迟发性脑病中的临床意义

姜 梅,魏金凤,李 娜

(中国人民解放军第二八一医院检验科,河北秦皇岛 066100)

摘要:目的 研究血清胱抑素 C(CysC)水平检测在一氧化碳中毒迟发性脑病(DEACMP)中的临床意义。方法 DEACMP 患者 53 例为 DEACMP 组,经历一氧化碳中毒(ACMP)但未出现 DEACMP 的患者 30 例为 ACMP 组,另选择健康体检者 30 例为健康对照组。CysC 采用乳胶颗粒增强免疫透射比浊法进行检测。结果 在急性一氧化碳中毒发生时,血清 CysC 水平在 DEACMP、ACMP 组较健康对照组均明显增高($P < 0.01$); DEACMP 组与 ACMP 组比较差异无统计学意义。在治疗后,DEACMP 组在假愈期后血清 CysC 仍然保持较高的水平,而 ACMP 组基本恢复至健康对照组水平。并且 DEACMP 组治疗后痊愈的患者血清 CysC 水平基本恢复到正常水平(0.85 ± 0.11)mg/L。治疗后疗效为好转的患者血清 CysC 为(1.33 ± 0.16)mg/L,仍高于正常水平;治疗后无效的患者血清 CysC 仍保持较高的水平(1.89 ± 0.21)mg/L,血清 CysC 水平与 DEACMP 的疗效呈正相关, ($r = 0.306, P < 0.01$)。结论 血清 CysC 检测有助于预测 DEACMP 的发生,并且与 DEACMP 的预后有关,经治疗后患者血清 CysC 水平恢复到正常水平者预后较好。

关键词:一氧化碳中毒; 脑疾病; 胱抑素 C; 临床意义

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.07.034

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)07-0794-02

一氧化碳中毒迟发性脑病(delayed encephalopathy after acute carbon monoxide poisoning, DEACMP)是指急性一氧化碳中毒(acute carbon monoxide poisoning, ACMP)经抢救恢复后,经过一定时期的假愈期后,再出现以急性痴呆、精神症状和锥体外系表现为主的神经系统疾病。DEACMP 的发生机制目前仍不明确,但是一旦发生 DEACMP,其治疗和功能恢复非常困难。近年来的研究提示,胱抑素 C(Cystatin C, CysC)跟动脉粥样硬化包括冠心病以及外周动脉疾病等的发生和发展及预后密切相关^[1]。但是在 DEACMP 的作用未见报道,为探讨 CysC 水平检测在 DEACMP 患者中的临床意义,本组检测了 53 例 DEACMP 患者血清 CysC 水平,并与经历一氧化碳中毒(ACMP)未发生 DEACMP 的 ACMP 患者及同期健康体检者

各 30 例进行比较。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本院 2006 年 1 月至 2010 年 1 月收治的 DEACMP 患者 53 例为研究对象(DEACMP 组),其中男 35 例,女 18 例,年龄 34~79 岁,平均年龄 65.3 岁。均明确临床诊断 ACMP 并出现 15~35 d 假愈期后出现精神神经症状,符合 DEACMP 的诊断。疗程 4~16 周,其中经治疗后基本恢复患者原来状态为痊愈(12 例);留有一定的智力及肢体活动障碍但较发病初期好转者为好转(26 例);经治疗无效或死亡者视为无效(5 例)。经历 ACMP 但未出现 DEACMP 患者 30 例(ACMP 组),男 20 例,女 10 例,年龄 32~78 岁,平均 63.1 岁。另选择健康体检者 30 例(健康对照组),男、女性各 15 例,年龄