

• 检验技术与方法 •

实时荧光定量 PCR 在 EB 病毒 DNA 检测中的应用

黎庆梅¹, 陈 辉¹, 庄碧英²

(1. 暨南大学医学院第四附属医院/广州市红十字会医院检验科 510220;
2. 中山大学达安基因股份有限公司, 广州 510080)

摘 要:**目的** 探讨实时荧光定量 PCR 技术在检测患者外周血单个核细胞(PBMC)中 EB 病毒(EBV)DNA 定量的临床应用, 比较实时荧光定量 PCR 在检测血浆和 PBMC 中 EBV DNA 含量的差别, 并研究 EBV 阳性患者的病种分布特点。**方法** 应用罗氏 LightCycler 荧光定量 PCR 仪检测 375 例患者 PBMC 中 EBV DNA 含量, 所有阳性患者均用血浆进行复查, 比较其差别, 并回顾性分析患者临床特点。**结果** 检测 PBMC 中 EB 阳性标本 35 例, 阳性率为 9.3%。阳性患者中鼻炎 13 例, 鼻咽癌 4 例, 鼻息肉 4 例, 肺炎 7 例, 急性淋巴细胞性白血病 1 例, 传染性单核细胞增多症 6 例。取阳性标本检测其血浆游离 EB DNA, 33 例阳性, 其拷贝数低于相应标本中 PBMC 中的拷贝数。**结论** 实时荧光定量 PCR 技术检测 PBMC 和血浆中 EB DNA 准确, 快速, 在确诊 EBV 感染相关性疾病中具有重要的作用, 且检测 PBMC 中 EB DNA 可能更优于检测血浆中 EB DNA。

关键词: 疱疹病毒 4 型, 人; 聚合酶链反应; 单个核细胞

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.13.009 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)13-1423-02

EB 病毒(Epstein-Barr virus, EBV)是 1964 年 Epstein 和 Barr 在研究非洲儿童淋巴瘤(BL)时, 从瘤细胞培养中发现的一种病毒, 是传染性单核细胞增多症的病原, 并与 BL 和鼻咽癌有关。EBV 流行广泛, 80%~90% 成人曾发生过 EBV 感染。幼儿感染后多数无明显症状, 或引起轻度咽炎和上呼吸道感染, 约有 50% 出现传染性单核细胞增多症。病毒主要通过唾液传播, 也可因输血传染。感染后 EBV 可能先在口咽部上皮细胞内增殖。然后病毒感染局部黏膜的 B 细胞, 这些细胞进入血循环而造成全身性 EBV 感染。EBV 感染也是造成移植失败的原因之一^[1]。

EBV 感染比较常见并与多种疾病密切相关, 因此实验室诊断显得尤为重要。目前检测 EBV 的主要方法有病毒分离培养、血清学诊断、实时荧光定量聚合酶链反应(FQ-PCR)等。由于 FQ-PCR 技术的发展, 可用该技术直接检测 EBV DNA 含量。本文采用实时荧光定量 PCR 技术检测患者外周血单个核细胞(PBMC)和血浆中 EBV DNA。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2006 年 6 月至 2008 年 9 月, 广州市红十字会医院门诊和住院患者 375 例, 其中男性 172 例, 女性 203 例, 年龄 0~82 岁。

1.2 检测方法

1.2.1 仪器和试剂 LightCycler 基因扩增仪(罗氏公司); EBV PCR 荧光检测试剂盒(中山大学达安基因公司)。

1.2.2 标本采集 抽取受检者静脉血 2 mL, 注入含 EDTA 的采血管, 立即轻轻颠倒采血管 5~10 次, 使抗凝剂与静脉血充分混合, 立即送检。

1.2.3 PBMC 中 EB DNA 的提取 用 2 mL Ficoll 分离液提取 1 mL EDTA 抗凝血中 PBMC, 加入 1.5 mL 离心管, 12 000 r/min 离心 5 min; 去上清液后向沉淀中加入 50 μ L DNA 提取液, 充分混匀, 100 $^{\circ}$ C 恒温处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后备用。

1.2.4 血浆中 EB DNA 的提取 将 EDTA 抗凝血

4 000 r/min 离心 10 min 后取 50 μ L 血浆置于 Eppendorf 管中, 加入 50 μ L DNA 提取液后充分混匀, 100 $^{\circ}$ C 恒温处理 10 min, 12 000 r/min 离心 5 min 后备用。

1.2.5 PCR 扩增 扩增程序和结果分析按 LightCycler 操作规程进行, 同时设置阴性对照和阳性对照。阴性结果为小于 500 copy/mL。

2 结 果

共检测标本 375 例, PBMC 中 EBV DNA 阳性 35 例, 阳性率为 9.3%, 阳性值在 $(1.1 \times 10^3 \sim 3.8 \times 10^6)$ copy/mL, 平均 2.2×10^5 copy/mL; 阳性患者中鼻炎 13 例、鼻咽癌 4 例、鼻息肉 4 例、肺炎 7 例、急性淋巴细胞性白血病 1 例、传染性单核细胞增多症 6 例。取阳性标本检测其血浆游离 EBV DNA, 33 例阳性, 其拷贝数低于相应标本中 PBMC 中的拷贝数。见表 1。

表 1 阳性患者 PBMC 和血浆中 EBV DNA 含量的比较

组别	阳性(n)	均值(copy/mL)	范围(copy/mL)
PBMC 组	35	2.2×10^5	$1.1 \times 10^3 \sim 3.8 \times 10^6$
血浆组	33	8.1×10^4	$9.6 \times 10^2 \sim 2.7 \times 10^6$

3 讨 论

EBV 是疱疹病毒科 γ 亚科中惟一能引起人类感染的淋巴滤泡病毒, 也是最早被识别的人类肿瘤病毒^[2], 被认为是多种恶性肿瘤(如鼻咽癌)的病因之一, 主要感染人类口咽部的上皮细胞和 B 淋巴细胞。

EBV 长期潜伏在淋巴细胞内, 以环状 DNA 形式游离在胞浆中, 并整合在染色体内。临床检测 EBV 大多用 ELISA, 但由于 EBV 在儿童时期出现感染高峰, 所以 ELISA 阳性率偏高, 不能准确地指导临床。PCR 技术是 20 世纪 80 年代中期发展起来的体外核酸扩增技术, 具有特异、敏感、产率高、快速、简便、重复性好、易自动化等突出优点; 能在 1 个试管内将所要研究的基因或某一 DNA 片段于数小时内扩增至十万乃至百万倍, 便于结果的判断。FQ-PCR 技术是一种新型的可作

定量分析的 PCR 技术,目前,在分子诊断方面主要应用于对细胞中 DNA 和 RNA 的定量测定,不仅可以检测宿主存在的多种 DNA 和 RNA 病原体的载量,还可以检测多基因遗传病时细胞中 mRNA 的表达量^[4]。有学者建议用 FQ-PCR 和 ELISA 联合检测 EBV;但也有学者应用 FQ-PCR 检测血浆和 PBMC 中 EBV DNA 含量^[5]。

本研究采用 FQ-PCR 检测 375 例患者 PBMC 中 EBV DNA,结果显示 EBV 阳性患者患有鼻咽癌、鼻炎、鼻息肉、传染性单核细胞增多症、肺炎、急性淋巴细胞性白血病等各种疾病,提示 EBV 感染可能在这些疾病的发病机制中有重要的作用。取 PBMC 中 EBV DNA 阳性标本检测其血浆游离 EBV DNA,在 35 例中有 33 例阳性,且血浆中拷贝数低于相应 PBMC 中的拷贝数。可能是由于 EBV 长期潜伏在淋巴细胞内,以环状 DNA 形式游离在胞浆中,并整合在染色体内,在血浆中的含量少。该结果表明用 FQ-PCR 可对全血中 EBV 进行准确、快速的定量,且灵敏度高,在确诊 EBV 感染相关性疾病中具有重要的作用。用 FQ-PCR 检测外周血 PBMC 中 EBV DNA 的含量可能更优于检测血浆中的含量,但还需做更深入的研究。

(上接第 1418 页)

5%、21%和 47%;有 1 株阴沟肠杆菌产 KPC 型碳青霉烯酶,对亚安培南耐药。肠球菌属对万古霉素、替考拉宁及利奈唑烷均敏感,但对其他抗菌药物的耐药率较高达 63%~100%。本文肠球菌属引起的尿路感染占第 2 位(41%),81%肠球菌属对氨基糖苷类药物表现高度耐药,也就是氨基糖苷类高水平耐药(HLAR),对于 HLAR 菌株,青霉素和氨基糖苷类药物联合治疗无效,须使用万古霉素。

综上所述,尿毒症患者由于存在免疫功能缺陷,且局部环境不良,都为感染提供了有利的条件,所以应提高患者整体抗感染能力,同时避免滥用抗菌药物。对已发生感染的患者在使用抗菌药物前应及时采集标本进行细菌培养和药物敏感试验,根据试验结果及时调整治疗方案;同时应重视医院内耐药细菌的监测,掌握病原菌的耐药趋势,减少耐药菌的产生。

参考文献

[1] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国临床检验操作规程[M].3 版.南京:东南大学出版社,2006:744.

[2] Himmelfrb J,Hakim BM. Biocompatibility and risk of infection in hemodialysis patient[J]. Nephrol Dial Transplant, 1994, 9(1): 134-144.

[3] Cohen G,Weber MH,Horl WH. Immune dysfunction in uremia [J]. Kin Int,1997,62 Suppl:579-582.

[4] Ando M,Shibuya A,Yasuda M,et al. Impairment of innate cellular response to in vitro stimuli in patients on continuous ambulatory

参考文献

[1] Merlino C,Cavallo R,Bergallo M,et al. Epstein barr viral load monitoring by quantitative PCR in renal transplant patients[J]. New Microbiol,2003,26(2):141-149.

[2] Epstein M,Achong B,Bart Y. Virus particles in cultured lymphoblasma from Burkitt's lymphoma[J]. Lancet, 1964, 1(4): 702-703.

[3] 刘玉静,崔晓梅,李俊,等. 荧光定量 PCR 检测儿童 EB 病毒感染的临床研究[J]. 中华临床医学研究杂志,2007,13(13):1924-1925.

[4] 吕建新,尹一兵. 分子诊断学[M]. 北京:中国医药科技出版社,2004:4.

[5] Wagner HJ,Fischer L,Jabs WJ,et al. Longitudinal analysis of Epstein-Barr viral load in plasma and peripheral blood mononuclear cells of transplanted patients by real-time polymerase chain reaction[J]. Transplantation,2002,74(5):656-664.

(收稿日期:2011-04-13)

ry peritoneal dialysis[J]. Nephrol Dial Transplant,2005,20(11): 2497-2503.

[5] Lim WH,Kireta S,Leedham E,et al. Uremia impairs monocyte and monocyte-derived dendritic cell function in hemodialysis patients[J]. Kidney Int,2007,72(9):1138-1148.

[6] Verkade MA,van Druningen CJ,Vaessen LM,et al. Functional impairment of monocyte-derived dendritic cells in patients with severe chronic kidney disease[J]. Nephrol Dial Transplant,2007,22(1):128-138.

[7] Anding K,Gross P,Rost JM,et al. The influence of uremia and haemodialysis on neutrophil phagocytosis and antimicrobial killing [J]. Nephrol Dial Transplant,2003,18(10):2067-2073.

[8] Patole PS,Schubert S,Hildinger K,et al. Toll-like receptor 4:Renal cells and bone marrow cells signal for neutrophil recruitment during pyelonephritis[J]. Kidney Int,2005,68(6):2582-2587.

[9] 王海燕. 肾脏病学[M]. 北京:人民卫生出版社,1996:1385-1402.

[10] 董德长. 实用肾脏病学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1999: 781-782.

[11] 王丽萍,杜建. 慢性肾功能衰竭患者免疫功能状态的临床研究 [J]. 中级医刊,1998,33(9):7-9.

[12] 赵旺盛,许乃顺,葛高霞,等. 南京地区超广谱 β -内酰胺酶菌株调查及药敏分析[J]. 临床检验杂志,2000,18(4):233-234.

[13] 苏芬,滕林,安玉亮,等. 痰标本中产超广谱 β -内酰胺酶菌株的检测[J]. 中华医院感染学杂志,2002,12(3):232.

(收稿日期:2011-04-13)

误 差

误差指测量值与真值之差,也指样本指标与总体指标之差。包括系统误差、随机测量误差和抽样误差。系统误差指数数据收集和测量过程中由于仪器不准确、标准不规范等原因,造成观察(检测)结果呈倾向性的偏大或偏小,是不可避免或可通过研究设计解决的。随机测量误差指由于一些非人为的偶然因素使观察(检测)结果或大或小,是不可避免的。抽样误差指由于抽样原因造成样本指标与总体指标的差异,是不可避免但可减少的。