

• 临床检验研究论著 •

血液病患者外周血白细胞、血浆和血清中 EB 病毒 DNA 定量分析

王克迪, 吕 治, 王铁山, 苏建荣[△]

(首都医科大学附属北京友谊医院临床检验中心, 北京 100050)

摘要:目的 比较血液病患者外周血白细胞、血浆和血清的 EB 病毒载量, 探讨应用患者血清或者血浆检测 EB 病毒载量的可行性。方法 采集 125 例血液病患者的静脉血, 分别进行外周血白细胞、血浆和血清的分离, 应用荧光定量 PCR 技术检测三种标本中病毒载量, 以外周血白细胞 EB 病毒载量为金标准, 血浆和血清检测结果与之比较, 进行分析。结果 血浆和血清的 EB 病毒载量与外周血白细胞病毒载量相比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结论 应用患者血浆或血清进行血液 EBV DNA 定量检测, 将成为代替外周血白细胞的一种可靠方法。

关键词: EB 病毒; 外周血白细胞; 血清

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.16.017

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)16-2161-02

Quantitative analysis on EB virus DNA in peripheral white blood cell, plasma and serum in patients with hematologic diseases

Wang Kedi, Lv Zhi, Wang Tieshan, Su Jianrong[△]

(Clinical Laboratory Center, Beijing Friendship Hospital, Capital Medical University, Beijing 100050, China)

Abstract: Objective To compare the load of EB virus in peripheral white blood cell, plasma and serum in the patients with hematologic diseases, and to discuss the feasibility of detecting EB virus load by using plasma or serum instead of peripheral white blood cell. **Methods** Venous blood of 125 patients with hematologic diseases were collected, and peripheral white blood cell, plasma and serum were isolated. The real-time quantitative PCR was used to detect the virus load in three kinds samples with the EB virus load in peripheral blood cell as the gold standard. **Results** Compared to peripheral white blood, the EB virus load in plasma and serum showed no statistical difference ($P > 0.05$). **Conclusion** Using plasma or serum instead of peripheral white blood cell for conducting the quantitative detection of the load of EB virus will be a reliable method.

Key words: EB virus; peripheral white blood cell; serum

EB 病毒属疱疹病毒, 是第 1 个与人类肿瘤发生有明确联系的病毒。EB 病毒感染非常普遍, 主要侵犯机体的造血系统和淋巴系统, 如病毒相关嗜血细胞综合征、免疫功能受损的淋巴瘤患者合并 EB 病毒感染后, 病情的恶性发展以及移植后淋巴瘤组织增殖性疾病, 恶性淋巴系统疾病等, 都与 EB 病毒有密切的联系^[1-6]。因此, 定量检测和实时监测血液病患者体内 EB 病毒核酸载量有重要意义。目前, 临床实验室多数通过提取患者外周血白细胞, 应用荧光定量 PCR 技术检测 EB 病毒载量, 但大多数血液病患者外周血白细胞数量和功能都存在显著异常, 会影响病毒载量的检测, 因此, 寻找一种可以替代外周血白细胞的标本进行病毒载量检测十分重要。本文通过检测血液病患者外周血白细胞、血浆和血清的 EB 病毒载量, 进行对比分析, 探讨应用患者血清或者血浆检测 EB 病毒载量的可行性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选自 2011 年 8 月至 2012 年 1 月在北京友谊医院血液内科住院的患者, 共 125 例, 年龄在 12~46 岁, 其中, 嗜血细胞综合征 42 例, 血液系统恶性肿瘤 40 例, 骨髓移植术后 17 例, 异基因造血干细胞移植状态 16 例, 传染性单核细胞增多症 10 例。

1.2 仪器与试剂 ABI7300 PCR 分析仪(美国 ABI 公司)。EBV DNA 检测试剂盒购自中山大学达安基因有限公司, Ficoll 淋巴细胞分离液购自上海易佰聚生物。

1.3 方法

1.3.1 标本制备 用一次性无菌真空采血管(分别为 EDTA 类抗凝和分离胶促凝)抽取静脉血 4 mL, 轻轻混匀。(1)外周血单个核细胞分离: 取 EDTA 类抗凝全血 1 mL 置于灭菌离心管中, 加入生理盐水 1 mL 轻摇混匀, 取另一灭菌离心管, 加入 1 mL 淋巴细胞分离液(Ficoll 淋巴细胞分离液), 将稀释好的全血用加样器缓慢加入到加有淋巴细胞分离液的试管中(沿管壁滴加, 速度宜慢), 应用水平离心机, 2 000 r/min 离心 20 min。吸取白细胞层(从上往下的第 2 层), 加入到 1.5 mL 离心管中。(2)血浆制备: 取 EDTA 类抗凝全血 1 mL 置于灭菌离心管中 3 000 r/min 离心 5 min, 提取血浆。(3)血清制备: 分离胶促凝血 3 000 r/min 离心 5 min, 提取血清。

1.3.2 EB 病毒核酸提取 制备好的外周血单个核细胞、血浆和血清分别 12 000 r/min 离心 5 min。去上清, 沉淀加入 50 μ L 提取液充分混匀, 100 $^{\circ}$ C 恒温处理(10 \pm 1)min。12 000 r/min 离心 5 min, 上清液即为模板, 留取备用。

1.3.3 荧光定量 PCR 检测 PCR 反应总体积 45 μ L: PCR 反应液 40 μ L, Tag 酶 3.0 μ L, 模板 2.0 μ L。取 PCR 反应管 n 个 (n =标本数+1 管阴性质控品+1 管临界阳性质控品+4 管定量标准品), 分别加入处理好的标本、阴性质控品、阳性质控品和定量标准品上清液各 2 μ L, 8 000 r/min 离心数秒, 放入仪器样品槽。PCR 循环条件: 93 $^{\circ}$ C 2 min; 93 $^{\circ}$ C 45 s, 55 $^{\circ}$ C 60 s, 10 个循环; 93 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环。

1.4 结果判读 若增长曲线不呈 S 型或 Ct 值等于 30, 则标本的 EB-DNA 水平小于检测下限; 若增长曲线呈 S 型且 Ct 值

小于 30, 则按以下方法判读。若仪器分析结果小于 5×10^3 copy/mL, 则报告 EB-DNA 水平小于 5×10^3 copy/mL; 若仪器分析结果位于 $5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^7$ copy/mL, 则报告 EB-DNA 水平的确切数值; 若仪器分析结果大于 5×10^7 copy/mL, 则将样品提取的 DNA 用阴性质控品稀释到线性范围后再检测。

1.5 统计学处理 采用 SPSS13.0 软件进行数据分析, 计量资料采用 Kolmogorov-Smirnov 检验, 不符合正态分布的数据用(中位数±四分位数间距)表示, 组间比较采用非参数秩和检验; 计数资料采用 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 EBV DNA 载量检测结果 分别以外周血白细胞、血浆和血清作为检测标本, 125 例血液病患者的外周血 EB 病毒载量结果见表 1。以外周血白细胞检测 EBV DNA 载量作为金标准, 血浆和血清检测值与之进行 Wilcoxon Signed Ranks 检验, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 1 3 种方法检测 EBV DNA 载量结果比较 ($\bar{x} \pm s$)

项目	EBV DNA 载量 (copy/mL)	Z	P
外周血白细胞	$2.58 \times 10^5 \pm 8.2 \times 10^6$	—	—
血浆	$1.52 \times 10^5 \pm 9.8 \times 10^6$	-1.553	0.12
血清	$2.21 \times 10^5 \pm 7.9 \times 10^6$	-0.631	0.528

—: 无数据。

2.2 3 种方法检测 EBV DNA 阳性率及拷贝数数量级比较 分别以外周血白细胞、血浆和血清作为检测标本, 125 例血液病患者的外周血 EB 病毒 DNA 阳性率及阳性标本的病毒载量比较见表 2。在所有检测阴性(低于检测下限)标本中, 3 种方法检测结果均为阴性; 在所有检测阳性标本中, 3 种方法检测拷贝数数量级均一致, 提示 3 种检测方法比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

表 2 3 种方法检测 EBV DNA 阳性率及拷贝数数量级比较 (n/n)

项目	外周血白细胞	血浆	血清	χ^2	P
所有阴性标本	60/125	60/125	60/125	0.000	1.000
所有阳性标本	65/125	65/125	65/125	0.000	1.000
10 ⁸ 数量级	14/125	14/125	14/125	0.000	1.000
10 ⁷ 数量级	3/125	3/125	3/125	0.000	1.000
10 ⁶ 数量级	12/125	12/125	12/125	0.000	1.000
10 ⁵ 数量级	26/125	26/125	26/125	0.000	1.000
10 ⁴ 数量级	10/125	10/125	10/125	0.000	1.000

3 讨 论

ELISA 检测 EBV 各项抗体是临床诊断 EBV 感染的重要指标之一, 但它实际上是检测人体对 EBV 感染的免疫反应状态, 无法检测病毒自身, 也就无法更准确地反映 EBV 感染的情况。例如 EBV VCA-IgM 抗体的检测, 仅在 EBV 首次感染急性期可见抗体滴度有明显升高, 恢复期和无症状携带者抗体滴度稳定在低水平, 再次感染或免疫抑制患者往往不表现此

抗体的升高^[7]。进行临床基因诊断的新型定量检测方法对长期使用免疫抑制剂的移植患者或特异性感染患者, 可依据病毒荷载量的变化合理进行临床治疗, 并可更加有效地评估患者的治疗效果^[8-9]。

目前, 临床上用于检测患者血液中病毒 DNA 的标本有外周血白细胞、血浆和血清, 其中哪一种为最理想的检测标本, 尚未达成一致结论。外周血白细胞内 EB 病毒 DNA 检测可以反映现症感染, 也可以反映 EB 病毒感染潜伏期(细胞未裂解前)或者治愈后患者, 以此为检测标本, 可以提高阳性检出率^[10], 但同时也给临床增加了干扰信息。血清或血浆检出的病毒多为现症感染, 具有较好的操作性、简便、易获取且不受患者白细胞数量的影响, 尤其适用于白细胞异常的患者, 但不易发现潜伏期感染患者。3 种标本各有优缺点, 应根据临床情况, 选择合适的标本进行检测。

本研究结果显示, 以外周血白细胞检测 EBV DNA 载量作为金标准, 应用血清和血浆检测 EBV DNA 载量, 两者比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。在所有检测阴性(低于检测下限)标本中, 3 种方法检测结果均为阴性; 在所有检测阳性标本中, 3 种方法检测拷贝数数量级均一致, 上述结果提示, 3 种方法具有较好的一致性, 可以应用患者血清或血浆代替外周血白细胞, 进行血液 EBV DNA 定量检测。

参考文献

- [1] 吴玥. EB 病毒感染与血液病[J]. 实用儿科临床杂志, 2006, 21(15): 961-962.
- [2] 王钧, 孟庆祥, 张红宇, 等. 异基因造血干细胞移植病毒感染的临床特点及防治[J]. 临床血液学杂志, 2010, 23(5): 542-545.
- [3] Heller KN, Steinerz 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.
- [4] 汪洋, 许红梅. EB 病毒的流行病学研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2010, 31(12): 1405-1407.
- [5] 桂瑞瑞, 周健, 张艳莉, 等. EB 病毒感染与恶性血液病相关性研究[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2012, 6(3): 195-197.
- [6] 徐喜慧, 徐勇, 欧阳建, 等. 18 例 EB 病毒感染相关噬血细胞综合征临床分析[J]. 江苏医药, 2012, 38(17): 2089-2090.
- [7] 苏犁, 云徐锦, 孙家娥, 等. EB 病毒感染实验室诊断方法探讨[J]. 检验医学, 2006, 21(5): 513-515.
- [8] Wagner HJ, Fischer L, Jabs WJ, et al. Longitudinal analysis of Epstein-Barr virus load in plasma and peripheral blood mononuclear cells of transplanted patients by real time polymerase chain reaction[J]. Transplantation, 2002, 74(1): 656-664.
- [9] 陈天游, 范行良. EB 病毒诊断学意义及其方法学进展[J]. 微生物学免疫学进展, 2009, 37(3): 50-53.
- [10] 李金颖, 付丽娟, 邱顺祥, 等. EB 病毒检测与 EB 病毒感染诊断的研究[J]. 中国小儿急救医学, 2008, 15(6): 555-557.

(收稿日期: 2014-02-20)