

外周血细胞形态学检查与 EBV-DNA 定量分析 在小儿传染性单核细胞增多症早期诊断中的价值*

肖 波¹, 毛金娥¹, 陈万新²

(1. 荆门市第二人民医院病理科, 湖北荆门 448000;

2. 华中科技大学同济医学院附属协和医院血液病研究所, 武汉 430022)

摘要:目的 评价外周血异常淋巴细胞(异淋)形态学的检查和实时荧光定量 PCR 技术检测 EB 病毒 DNA 定量在小儿传染性单核细胞增多症早期诊断中的价值。方法 回顾性分析了 2013 年 1 月~2014 年 12 月收治的 212 例传染性单核细胞增多症的患儿, 分别抽取其发热初期和 1 周后抗凝静脉血做外周血涂片细胞形态学检查和实时荧光定量 PCR 技术检测 EBV-DNA 定量。结合患儿初诊时的临床表现进行综合分析。异型淋巴细胞 $>10\%$ 及 EBV-DNA 定量超过 1.0×10^3 拷贝为阳性。结果 在 212 例传染性单核细胞增多症的患儿中, 发热初期外周血涂片细胞形态学检查, 82 例异型淋巴细胞阳性, 100 例外周血 EBV-DNA 定量阳性。1 周后复检外周血, 156 例异型淋巴细胞阳性, 最高可达 56% ; 180 例 EBV-DNA 定量阳性。联合检测外周血细胞形态学异型淋巴细胞及 EBV-DNA 定量, 发热初期, 阳性 125 例, 较单纯外周血细胞形态学异型淋巴细胞检测($\chi^2=17.45, P<0.01$)及 EBV-DNA 定量检测($\chi^2=5.92, P<0.05$)均明显提高; 但 1 周后, 阳性 190 例, 较单纯外周血细胞形态学异型淋巴细胞检测明显升高($\chi^2=18.16, P<0.01$), 但与 EBV-DNA 定量检测比较, 无明显提高($\chi^2=2.12, P>0.05$)。结论 联合检测外周血细胞形态学及 EBV-DNA 定量对早期诊断小儿传染性单核细胞增多症十分重要, 结合临床表现, 能提高诊断的及时性及准确性。

关键词:实时荧光定量 PCR; EB 病毒; 异型淋巴细胞; 外周血细胞形态学检查

中图分类号: R512.7; R446.113, Q503 **文献标志码:** A **文章编号:** 1671-7414(2016)03-114-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7414.2016.03.032

Value of Detecting Peripheral Blood Cell Morphology Combined with EBV-DNA Quantity in the Initial Diagnosis for Infants Patients with Infectious Mononucleosis

XIAO Bo¹, MAO Jin-e¹, CHEN Wan-xin²

(1. Department of Pathology, Jingmen Second People's Hospital, Hubei Jingmen 448000,

China; 2. Hematopathy Research Institute, the Affiliated Union Hospital of Tongji

Medical College of Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To evaluate the value of detecting abnormal lymphocyte morphology in peripheral blood and Epstein Barr Virus (EBV) DNA quantity through real-time quantitative PCR (RT-qPCR) in the initial diagnosis for infants patients with infectious mononucleosis (IM). **Methods** From Jan. 2013 to Dec. 2014 212 infants patients with IM were analysed retrospectively, which were all in-patients in the hospital. The abnormal lymphocyte morphology in peripheral blood and Epstein Barr Virus (EBV) DNA quantity were both detected in the initial fever period and a week later. The latter was detected by real-time quantitative PCR (RT-qPCR), combined with all the symptoms were all analysed comprehensively. The percentage of abnormal lymphocyte more than 10% was positive, and the EBV-DNA quantity more than 1.0×10^3 copy per ml was positive, too. **Results** Of all the infants patients, in the initial fever period, 82 patients had more than 10% positive abnormal lymphocyte and 100 patients had positive EBV-DNA quantity. But a week later, 156 patients had more than 10% positive abnormal lymphocyte, the maximum abnormal lymphocyte was 56% . And 180 patients had positive EBV-DNA quantity. When both abnormal lymphocyte morphology in peripheral blood and Epstein Barr Virus (EBV) DNA quantity were detected, in the initial fever period, 125 patients were positive, it rose significantly more than that of abnormal lymphocyte morphology in peripheral blood ($\chi^2=17.45, P<0.01$), and that of Epstein Barr Virus (EBV) DNA quantity, too ($\chi^2=5.92, P<0.05$). But a week later, 190 patients were positive, it rose significantly more than that of abnormal lymphocyte morphology in peripheral blood ($\chi^2=18.16, P<0.01$). There was no significantly rising more than that of Epstein Barr Virus (EBV) DNA quantity ($\chi^2=2.12, P>0.05$). **Conclusion** The detecting of peripheral blood cell morphology combined with EBV-DNA

* 作者简介: 肖 波(1962-), 男, 本科, 副主任技师, 主要从事临床细胞学检验工作。

通讯作者: 毛金娥, E-mail: hbjmaj@163.com。

quantity are very important in the initial diagnosis for infants patients with infectious mononucleosis. Including all the symptoms, they could improve the diagnosis timely and accurately.

Keywords: real-time quantitative PCR(RT-qPCR); epstein barr virus(EBV); abnormal lymphocyte; peripheral blood cell morphology

传染性单核细胞增多症(infectious mononucleosis, IM)主要是由EB病毒感染引起的单核-巨噬系统急性增生性传染病,是儿科常见的感染性疾病。临床表现有发热、咽峡炎、淋巴结肿大、肝脾肿大、皮疹、眼睑浮肿。EB病毒感染在不同的免疫状态有不同的临床表现,首发症状也各不相同^[1],极易漏诊或误诊,有报道本病误诊率高达30%以上^[2]。

IM的早期诊断和治疗至关重要,我们联合检测外周血异常淋巴细胞形态学和EBV-DNA定量对小儿传染性单核细胞增多症(IM)的诊断,取得了满意效果。现对我院2013年01月~2014年12月收治的212例IM住院患儿的临床特点和实验室检查总结如下,旨在提高对本病的早期诊断。

1 材料与方法

1.1 研究对象 回顾性分析了2013年01月~2014年12月我院收治的212例IM住院患儿,年龄5个月~13岁,平均年龄7岁,均通过外周血异常淋巴细胞形态学的检查和/或EBV-DNA定量检测确诊为IM。IM诊断标准^[3]:①临床表现:发热、咽峡炎、淋巴结肿大、肝脾肿大;②外周血白细胞分类以淋巴细胞为主,异型淋巴细胞>10%;③EB病毒感染依据:EBV-DNA定量超过 1.0×10^3 copy/ml为阳性。具备诊断标准:①中任意3项,并同时具备③,有或无②,均可诊断IM。确诊的212例IM的患儿以学龄前儿童为主,3~7岁112例,具有典型临床表现155例;其中发热198例;咽峡炎、伴扁桃体炎192例;鼻塞92例;浅表淋巴结肿大(直径约0.5~2 cm)177例;肝肿大(肋下1~2 cm)83例;脾肿大(肋下1~3 cm)64例;肝脾均肿大63例;眼睑浮肿86例。IM可累及全身多个系统,其并发症最常见的为肝损伤(ALT增高)、心肌酶异常、肺炎、支气管炎、心肌炎、胸闷、心悸、腹痛、腹泻及头痛。

1.2 试剂和仪器 外周血涂片染色采用珠海贝索(BaSO)公司生产的瑞氏-姬姆萨染液(Wright-Giemsa)染色;EBV-DNA定量试剂购自百奥迈科生物技术有限公司,严格按说明书操作。

1.3 方法 分别抽取患儿发热初期和1周后抗凝静脉血做外周血涂片细胞学形态检查和实时荧光定量PCR技术检测EBV-DNA。外周血异型淋巴细胞检测:使用EDTA-K₂抗凝管,静脉采血1ml,颠倒混匀3~6次,血涂片2~3张,头体尾分明,厚

薄适宜,瑞氏-姬姆萨染液(Wright-Giemsa)染色,染色5~10 min,冲洗、晾干,用显微镜油镜镜检。由经过细胞学培训学习,技术娴熟的检验医师阅片,分类200个有核细胞,分出异型淋巴细胞所占百分比。EBV-DNA定量检测:静脉抽血1 ml,用EDTA-K₂抗凝,采用TaqMan荧光标记探针基因扩增技术进行测定,荧光探针序列为:FPEBV 5'-X-CCTCGGACAGCTCCTAAGAAGG-CACC-Y3', 26 bp。引物序列为:PQEBVF 5'-AAGC-CCAA-CACTCCACCAC-3', 19 bp;PQEBVR 5'-CTGGTAGGACT-GGGCGAC-3', 18 bp。PCR扩增条件:将各反应管放入PE5700 PCR仪按下列条件扩增:93℃ 2 min 预变性,然后93℃ 45 s, 55℃ 60 s, 10个循环;最后93℃ 30 s, 55℃ 45 s, 30个循环。实验同时设阴、阳性对照。

1.4 结果判断 外周血细胞形态学检查异型淋巴细胞>10%为阳性;EBV-DNA定量超过 1.0×10^3 copy/ml为阳性。

1.5 统计学分析 依据资料性质采用SPSS15.0行 χ^2 检验, $P > 0.05$ 为差异无统计学意义, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 为差异有统计学显著性意义。

2 结果

2.1 外周血细胞形态学检查异型淋巴细胞情况 212例IM发热初期,外周血细胞学形态检查,其中异型淋巴细胞阳性占82例;1周后复检外周血涂片,异型淋巴细胞阳性156例,最高可达56%。从形态学来看,绝大多数以泡沫样、单核样异型淋巴细胞为主,与邢宝利等^[4]报道一致,若患儿伴有淋巴结肿大和肝脾肿大,外周血涂片中易找到幼稚型异常淋巴细胞。

2.2 EBV-DNA定量检测情况 212例IM发热患儿采用PCR技术,进行EBV-DNA定量检测,发热初期EBV-DNA定量阳性100例,PCR检测EBV-DNA阳性略高于外周血异型淋巴细胞阳性数,二者之间进行比较,差异无统计学意义($\chi^2 = 3.12, P > 0.05$);1周后再次进行EBV-DNA定量检测,阳性180例,外周血异型淋巴细胞阳性数和EBV-DNA定量阳性数均有明显上升,但后者升高更明显,二者之间进行比较,差异有统计学显著性意义($\chi^2 = 8.26, P < 0.01$)。EBV-DNA定量阳性患儿异型淋巴>10%检出率大于EBV-DNA定量阴性患儿异型淋巴检出率^[5]。

2.3 联合检测外周血细胞形态学异型淋巴细胞及

EBV-DNA 定量情况 联合检测 212 例患儿在发病初期外周血细胞形态学异型淋巴细胞及 EBV-DNA 定量情况,阳性 125 例,较单纯外周血细胞形态学异型淋巴细胞检测($\chi^2 = 17.45, P < 0.01$)及 EBV-DNA 定量检测($\chi^2 = 5.92, P < 0.05$)均明显提高;但 1 周后,阳性 190 例,较单纯外周血细胞形态学异型淋巴细胞检测明显升高($\chi^2 = 18.16, P < 0.01$),但与 EBV-DNA 定量检测比较,无明显提高($\chi^2 = 2.12, P > 0.05$)。因此,在发热初期,联合检测外周血细胞形态学异型淋巴细胞及 EBV-DNA 定量,可显著提高诊断的阳性率。

3 讨论 IM 是由原发性 EB 病毒感染引起的一种淋巴组织良性自限性增殖性疾病^[6],可经过唾液、血液传播,并可长期潜伏在人体淋巴组织中,平时与人体相安无事,当机体免疫功能低下时,潜伏的 EB 病毒活化形成感染,可导致不同程度的疾病。临床分为急性或亚急性过程,病程多为自限性。欧洲国家 IM 多见于青少年和成人,年龄在 17~25 岁;而我国 IM 以儿童感染为多见,3~5 岁儿童的感染率高达 90%,是 IM 的高发年龄段。

异型淋巴细胞的形成多是因为病毒和 B 淋巴细胞受体结合后,在不断增殖与复制的过程中^[7],被体内的 T 淋巴细胞所识别,从而有效激活了抑制性 T 细胞的增殖和自身转化^[8],进而导致了细胞毒性效应的产生。在循环血液中,受刺激后异常增殖的 T 淋巴细胞发生形态变异,与原来的正常形态的 T 细胞有很明显的差别^[9],两者都是因为病毒或过敏原等刺激下增生亢进形成。外周血异型淋巴细胞的增多以病毒感染(特别是 EB 病毒感染)较为多见,临床上以 1 型和 2 型较为常见^[10]。

笔者回顾性分析了 212 例 IM 患儿在发热初期,外周血异型淋巴细胞阳性占 38.7%,1 周后占 73.6%。随着疾病进展,异型淋巴细胞比值逐渐升高。临床研究发现^[11],IM 无单一显著症状,通过症状确诊具有一定的难度,误诊或漏诊率较高。IM 患儿在发热初期时难以检测到异型淋巴细胞升高,7 天后患者外周血液中异型淋巴细胞含量会增长 12%~16%,在 2 周后异淋百分比逐渐下降,凋亡的淋巴细胞百分比逐渐升高。这就是为什么有些患儿异型淋巴阳性不高的原因。

荧光定量 PCR 法检测 EBV-DNA 是近年发展起来的技术,其扩增和产物检测一步完成,能够准确地检测病毒的拷贝数,更准确地反映 EB 病毒感染和病毒复制情况。该方法操作简便、重复性好、易于标准化,对于 EBV 感染相关性疾病的诊断具有特异性与敏感的特点。本组 212 例在发热初期至发病 1 周后,EBV-DNA 定量检测,阳性数由 100

例上升到 180 例,在临床中,对于那些临床症状不典型,血清学不能诊断的疑似 IM 患儿,进行 EBV-DNA 检测,可以对发热初期的 IM 患儿早期确诊、避免抗生素的滥用、及时缓解病情,以及避免并发症的发生都具有重要的意义。虽然血清学抗体 VCA-IgM 和 VCA-IgG 在患儿发热初期呈阳性,但由于小儿免疫功能尚未发育完善,抗体的产生多为低亲和力,不易检出。IM 患儿外周血中 EB 病毒抗体在 2 周内达到峰值,随后很快下降。EBV-DNA 检测法不受体液免疫功能的影响^[12],有更快、更简便、更准确的特性,有较高的防止误诊、漏诊的价值。雷宏涛等^[13]亦报道,采用荧光定量 PCR 方法检测患儿治疗前后 EBV-IgM 抗体与 EBV-DNA,EBV-DNA 检测阳性率显著高于 EBV-IgM 检测阳性率,临床进行 7 天~10 天的治疗后,EBV-DNA 检测阳性率更加显著高于 EBV-IgM 检测阳性率。

由本研究可知,212 例 IM 发热初期,外周血细胞形态学检查,其中异型淋巴细胞阳性占 82 例;1 周后复检外周血涂片,异型淋巴细胞阳性 156 例,最高可达 56%。对于 EBV-DNA 定量检测,发热初期阳性 100 例,EBV-DNA 阳性略高于外周血异型淋巴细胞阳性数,二者之间进行比较,差异无统计学意义;1 周后阳性 180 例,外周血异型淋巴细胞阳性数和 EBV-DNA 定量阳性数均有明显上升,但后者升高更明显,二者之间进行比较,具有非常显著统计学意义。EBV-DNA 定量阳性患儿异型淋巴细胞阳性检出率 > EBV-DNA 定量阴性患儿异型淋巴细胞检出率^[5]。

发热初期,联合检测外周血细胞形态学异型淋巴细胞及 EBV-DNA 定量,阳性 125 例,较单纯外周血细胞形态学异型淋巴细胞检测及 EBV-DNA 定量检测均明显提高;但 1 周后,阳性 190 例,较单纯外周血细胞形态学异型淋巴细胞检测明显升高,但与 EBV-DNA 定量检测比较,无明显提高。因此,在发热初期,联合检测外周血细胞形态学异型淋巴细胞及 EBV-DNA 定量,可显著提高诊断的阳性率,与严海燕等^[14]报道的一致。

总之,联合检测外周血细胞学形态及 EBV-DNA 定量对早期诊断小儿传染性单核细胞增多症十分重要,结合临床表现,能提高诊断的及时性及准确性。

参考文献:

- [1] 李中跃,楼金环,陈洁. 儿童 EB 病毒感染首发症状及其相关疾病谱分析[J]. 中华儿科杂志,2004,42(1):20-22.

(下转 120 页)

- Kunming University of Science and Technology(Natural Science Edition), 2013, 38(6):115-120.
- [6] 王翠茹,孙辰军,杨静,等.改进残差灰色预测模型在负荷预测中的应用[J].电力系统及其自动化学报, 2010, 18(1):86-89.
- Wang CR, Sun CJ, Yang J, et al. Application of modified residual error gray prediction model in power load forecasting[J]. Proceedings of the CSU-EPSA, 2010, 18(1):86-89.
- 收稿日期:2015-09-21
修回日期:2016-03-14
-
- (上接 116 页)
- Li ZY, Lou JG, Chen J. Analysis of primary symptoms and disease spectrum in Epstein-Barr virus infected children[J]. Chin J Pediatr, 2004, 42(1):20-22.
- [2] Kasahara Y, Yachie A. Cell type specific infection of Epstein-Barr virus (EBV) in EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis and chronic active EBV infection[J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 44(3):283-294.
- [3] Tsai MH, Hsu CY, Yen MH, et al. Epstein-Barr virus-associated infectious mononucleosis and risk factor analysis for complications in hospitalized children[J]. Microbiol Immunol Infect, 2005, 38(4):255-261.
- [4] 邢宝利, 宁尚勇, 王伟良, 等. 血涂片分类中异型淋巴细胞形态学特征分析及临床意义探讨[J]. 临床血液学杂志, 2013, 26(1):42-43.
- Xing BL, Ning SY, Wang WL, et al. The morphological features and clinical significance of atypical lymphocytes in white blood cell differential count[J]. J Clin Hematol(China), 2013, 26(1):42-43.
- [5] 廖楚舒, 曹友德, 叶剑荣, 等. EBV DNA 定量检测对儿童传染性单核细胞增多症早期诊断的临床意义[J]. 实用预防医学, 2014, 21(8):991-993.
- Liao CS, Cao YD, Ye JR, et al. Clinical significance of quantitative detection of Epstein-Barr virus DNA in children with fever for the early diagnosis of infectious mononucleosis[J]. Pract Prev Med, 2014, 21(8):991-993.
- [6] Cohen JL. Epstein-Barr virus infection[J]. N Engl J Med, 2000, 343(7):481-492.
- [7] 杨结平, 姚君, 高忻, 等. 儿童传染性单核细胞增多症 32 例的临床特点分析[J]. 现代中西医结合杂志, 2011, 20(5):599.
- Yang JP, Yao J, Gao X, et al. Clinical features analysis of thirty-two children with infectious mononucleosis diseases[J]. Modern Journal of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, 2011, 20(5):599.
- [8] 陆颖, 刘勇, 237 例肺炎支原体感染患儿外周血涂片形态学特征分析[J]. 中外健康文摘, 2010, 7(17):50-51.
- Lu Y, Liu Y. Morphologic analysis of peripheral blood smear in 237 cases with mycoplasma pneumoniae infection in children[J]. World Health Digest, 2010, 7(17):50-51.
- [9] 张清秀, 王艳, 李启亮, 等. 儿童感染性疾病异型淋巴细胞的检测结果分析[J]. 职业与健康, 2009, 25(2):120-122.
- Zhang QX, Wang Y, Li QL, et al. Analysis of the results of determining atypical lymphocytes in children with infectious diseases[J]. Occup and Health, 2009, 25(2):120-122.
- [10] 郭红霞. 儿童肺炎支原体感染误诊为传染性单核细胞增多症的临床分析[J]. 实用临床医药杂志, 2011, 15(13):126-127.
- Guo HX. Clinical analysis of mycoplasma pneumonia misdiagnosed as infectious mononucleosis in children[J]. Journal of Clinical Medicine in Practice, 2011, 15(13):126-127.
- [11] 吴雪梅. EB 病毒 DNA 监测对传染性单核细胞增多症诊断的重要性研究[J]. 中华医院感染学杂志, 2013, 23(10):2280-2281, 2286.
- Wu XM. Detection of EBV-DNA in blood of patients with infectious mononucleosis and its clinical significance[J]. Chinese Journal of Nosocomiology, 2013, 23(10):2280-2281, 2286.
- [12] Bavender T. Epstein-Barr virus, cytomegalovirus, and infectious mononucleosis[J]. Adolesc Medicine State of the Art Rev, 2010, 21(2):251-264.
- [13] 雷宏涛, 王杰民, 王晓娟, 等. EBV-IgM 与 EBV-DNA 检测在小儿传染性单核细胞增多症诊治中的应用价值[J]. 陕西医学杂志, 2014, 43(4):427-428.
- Lei HT, Wang JM, Wang XJ, et al. The value of detecting of Epstein-Barr virus IgM and DNA in the diagnosis and treatment for infants patients with infectious mononucleosis (IM)[J]. Shaanxi Medicine Journal, 2014, 43(4):427-428.
- [14] 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.
- Yan HY, Luo XH, Chen J, et al. Combined detection of Epstein-Barr virus antibodies and DNA can improve the diagnosis sensitivity in pediatric mononucleosis[J]. Chinese Journal of Microecology, 2011, 23(6):540-542.
- 收稿日期:2015-10-29
修回日期:2016-02-20