

· 论 著 · DOI:10. 3969/j. issn. 1672-9455. 2018. 16. 024

EBV-DNA 与 VCA-IgM、VCA-IgG 亲和力检测在 儿童 EB 病毒早期感染中的差异研究

陈炳龙, 杜红心, 周 政

(重庆三峡中心医院医学检验科 401400)

摘 要:目的 分析 EB 病毒(EBV)-DNA 与衣壳抗原 IgM 抗体(VCA-IgM)、衣壳抗原 IgG 抗体(VCA-IgG)亲和力检测在儿童 EBV 早期感染中的差异,评价 EBV-DNA 在 EBV 早期感染中的诊断价值。方法 收集疑似 EBV 急性感染的患儿血液标本 154 例,使用酶联免疫吸附试验检测 VCA-IgM、VCA-IgG、VCA-IgG 亲和力、早期抗原抗体 IgG(EBVEA-IgG)、核抗原抗体 IgG(EBVNA-IgG);比较 EBV-DNA 与 VCA-IgM、低亲和力 VCA-IgG 之间阳性率的差异,分析其检测一致性,并初步探讨可能的原因。结果 EBV-DNA、VCA-IgM 及低亲和力 VCA-IgG 阳性率分别为 29.87%、10.39%、37.66%。EBV-DNA 与 VCA-IgM 之间具有较弱的一致性(Kappa=0.237),与 VCA-IgG 亲和力之间没有一致性(Kappa=-0.009)。3 种检测结果组合模式中单独 EBV-DNA、低亲和力 VCA-IgG 阳性占所有 EBV-DNA、低亲和力 VCA-IgG 阳性标本的比例分别达 60.9%(28/46)、63.8%(37/58),明显高于 VCA-IgM(6.25%);EBV-DNA 与低亲和力 VCA-IgG 同时阳性的标本仅 7 例。EBV-DNA 仅在近期感染组中与 VCA-IgM 及低亲和力 VCA-IgG 阳性率比较,差异无统计学意义($P=0.873$),一致性也较好,并可在既往感染组标本中检出。结论 EBV-DNA 检测阳性率较高,但与 EBV 抗体检测一致性较差,且受既往感染的干扰,对儿童 EBV 急性感染的诊断价值尚需深入研究。

关键词:儿童; EB 病毒; 衣壳抗原; 脱氧核糖核酸

中图法分类号:R446

文献标志码:A

文章编号:1672-9455(2018)16-2441-04

Differences of EBV-DNA and VCA-IgM, VCA-IgG affinity in early EBV infection in children

CHEN Binglong, DU Hongxin, ZHOU Zheng

(Department of Clinical Laboratory, Three Gorges Central Hospital of
Chongqing, Chongqing 401400, China)

Abstract: **Objective** To analyze the difference of EBV-DNA, capsid antigen IgM antibody (VCA-IgM) and VCA-IgG affinity detection in children with early EBV infection, and to evaluate the diagnostic value of EBV-DNA in early EB virus infection. **Methods** A total of 154 children with suspected EBV infection were collected. VCA-IgM, VCA-IgG, VCA-IgG affinity, early antigen antibody IgG (EBVEA-IgG), nuclear antigen antibody IgG (EBVNA-IgG) were detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The differences of the positive rate among EBV-DNA, VCA-IgM and VCA-IgG affinity tests were compared, the consistency of the test and to explore the possible causes preliminarily was analyzed. **Results** The positive rates of EBV-DNA, VCA-IgM and low-avidity VCA-IgG were 29.87%, 10.39% and 37.66% respectively. The results of EBV-DNA tests were in weak agreement with VCA-IgM (Kappa=0.237) and were no consistency with VCA-IgG avidity (Kappa=-0.009). The positive rate of EBV-DNA and low-affinity VCA-IgG alone was 60.87% (28/46) and 63.79% (37/58) in all EBV-DNA positive and low-affinity VCA-IgG positive samples respectively, significantly higher than VCA-IgM (6.25%). Moreover, only seven cases were positive for both EBV-DNA and low-affinity VCA-IgG. Only in the recent infection group, the positive rate of EBV-DNA was closed to VCA-IgM and low-affinity VCA-IgG and the difference was not statistically significant ($P=0.873$), the consistency was also good. And besides, only EBV-DNA could be detected in samples of previous infection groups. **Conclusion** The positive rate of EBV-DNA detection is high, but the consistency with EBV antibody detection is poor and it also could be positive in previous infections samples. The diagnostic value of acute infection with EBV in children still needs further evaluation.

Key words: children; EB virus; viral capsid antigen; desoxyribonucleic acid

EB 病毒(EBV)是一种广泛流行的病毒,在世界范围内,95%以上的成年人感染过该病毒^[1]。发达国家的初次感染多发生于青少年,而发展中国家初次感染常发生在儿童期。在我国,EBV 也是儿童感染的重

要病原体^[2], 儿童感染 EBV 后可无明显症状, 也可有发热、咽痛、淋巴结肿大、肝功能异常、脾大等非特异性表现, 容易误诊。因此, 实验室检查对 EBV 感染的诊断具有关键价值, 是临床诊断中不可缺少的依据。EBV 感染的血清学反应复杂, 相关检测项目较多, 目前, 在判断早期感染中, 衣壳抗原 IgM 抗体 (VCA-IgM)、VCA-IgG 亲和力及 EBV-DNA 是常用的指标^[3]。EBV-DNA 作为病毒的成分, 不受患者状态的影响, 理论上是一种更好的检测靶向标志物, 但在临床工作中常发现与免疫方法结果存在差异, 干扰疾病的诊断。本文拟通过回顾疑似患儿的 EBV-DNA 和 EBV 抗体检测资料, 对 EBV-DNA、VCA-IgM 及 VCA-IgG 亲和力进行比对、分析, 寻找其诊断差异的原因, 现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 以 2017 年 2—10 月在本院就诊, 疑似为 EBV 急性感染的患儿 154 例作为研究对象, 年龄 1 个月至 12 岁 (中位年龄 3 岁), 其中男 81 例, 女 73 例。大部分患儿有不同程度的纳差、发热、咽痛、淋巴结肿大、肝脾肿大等症状, 部分血常规淋巴细胞增高。每个患儿收集 2 份血液标本, 一份用于分离血清做 EBV 相关抗体检测; 另一份做 EBV-DNA 检测, 使用外周血白细胞进行检测。

1.2 仪器与试剂 罗氏 LightCycler1.2 荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 仪、美国热电 MK3 酶标仪。VCA-IgM、VCA-IgG 亲和力、早期抗原抗体 IgG (EBVEA-IgG)、核抗原抗体 IgG (EBVNA-IgG) 检测试剂盒 (德国欧蒙医学诊断有限公司)、EBV 核酸扩增 PCR 荧光检测试剂盒 (中山大学达安基因股份有限公司)。

1.3 方法

1.3.1 VCA-IgM、VCA-IgG、VCA-IgG 亲和力、EBVEA-IgG、EBVNA-IgG 检测 使用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 进行检测, 阳性标准及技术操作严格按说明书进行。

1.3.2 EBV-DNA 检测 使用 EBV 核酸扩增 PCR 检测外周血白细胞中 EBV-DNA, 严格按说明书操作, 根据文献^[4]报道, 以最佳临界点 10^3 copy/mL 为阳性标准。

1.4 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行分析。计数资料采用百分数表示, 组间比较采用 χ^2 检验或

Fisher 确切概率法。采用 Kappa 检验对 3 种指标亲和力的一致性进行分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 低亲和力 VCA-IgG、VCA-IgM、EBV-DNA 阳性率比较 154 例标本中 VCA-IgG 低亲和力标本占 37.66% (58/154), VCA-IgM 阳性标本占 10.39% (16/154), EBV-DNA 阳性率为 29.87% (46/154)。低亲和力 VCA-IgG 与 EBV-DNA 阳性率之间差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.014, P = 0.906$), 且明显高于 VCA-IgM 阳性率 ($\chi^2 = 18.889, P < 0.001$; $\chi^2 = 12.885, P < 0.001$)。此外, 根据年龄, 将患儿分为年龄 ≤ 4 岁组和年龄 > 4 岁组。结果显示, 低亲和力 VCA-IgG 阳性率在年龄 ≤ 4 岁组高于年龄 > 4 岁组, 差异有统计学意义 ($P = 0.026$)。见表 1。

表 1 不同年龄组患儿 VCA-IgG 亲和力、VCA-IgM、EBV-DNA 阳性情况比较 [$n(\%)$]

年龄 (岁)	<i>n</i>	VCA-IgM	低亲和力 VCA-IgG	EBV-DNA
≤ 4	97	11 (11.34)	43 (44.33)	25 (25.77)
> 4	57	5 (8.77)	15 (26.32)	21 (36.84)
<i>P</i>		0.614	0.026	0.147

2.2 EBV-DNA、VCA-IgM、VCA-IgG 亲和力检测结果的一致性研究 VCA-IgM 与 VCA-IgG 亲和力 (Kappa = 0.257)、EBV-DNA 检测结果 (Kappa = 0.237) 之间具有较差的一致性; 而 EBV-DNA 与 VCA-IgG 亲和力检测结果间无一致性 (Kappa = -0.009)。

2.3 EBV-DNA、VCA-IgM、VCA-IgG 亲和力检测结果组合模式分析 3 种检测结果的组合表现出一定的特征, 主要为单独 EBV-DNA 阳性及单独低亲和力 VCA-IgG 模式占有所有 EBV-DNA 阳性标本及低亲和力 VCA-IgG 标本的比例较高, 分别为 60.9% (28/46)、63.8% (37/58), 明显高于单独 VCA-IgM 阳性标本所占比例 [6.25% (1/16)]。VCA-IgM 阳性 + VCA-IgG 低亲和力共 4 例; VCA-IgM 阳性 + EBV-DNA 阳性共 1 例; EBV-DNA 阳性 + VCA-IgG 低亲和力共 7 例; VCA-IgM 阳性 + EBV-DNA 阳性 + VCA-IgG 低亲和力共 10 例。

表 2 低亲和力 VCA-IgG、VCA-IgM、EBV-DNA 与其他抗体间关系 [$n(\%)$]

项目	<i>n</i>	VCA-IgM 阳性	低亲和力 VCA-IgG	EBV-DNA 阳性	<i>P</i>
VCA-IgG 阳性 + EBVNA-IgG 阳性	19	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (36.8)	< 0.01
VCA-IgG 阳性 + EBVEA-IgG 阳性	9	7 (77.8)	7 (77.8)	8 (88.9)	0.873
VCA-IgG 阳性	108	9 (8.3)	51 (47.2)	31 (28.7)	< 0.01

2.4 EBV-DNA、低亲和力 VCA-IgG、VCA-IgM 在不同感染阶段的分布规律 在本研究的 154 例标本

中, 3 种检测阳性标本都伴有 VCA-IgG 阳性。检测 EBVEA-IgG、恢复期抗体 EBVNA-IgG, 以同时

VCA-IgG、EBVNA-IgG 阳性为既往感染,同时 VCA-IgG、EBVEA-IgG 阳性为近期感染,单独 VCA-IgG 阳性为不确定感染阶段,将 VCA-IgG 阳性标本分为 3 组,进一步分析 VCA-IgG 低亲和力、VCA-IgM、EBV-DNA 在 3 组中的分布规律,结果显示,既往感染的患儿,3 种抗体的阳性率差异有统计学意义($P<0.01$);近期感染的患儿,3 种抗体的阳性率差异无统计学意义($P=0.873$),且 VCA-IgM 与 VCA-IgG 低亲和力、VCA-IgM 与 EBV-DNA、EBV-DNA 与 VCA-IgG 低亲和力的 Kappa 值分别为 1.000、0.609、0.609;不确定感染阶段的患儿,3 种抗体的阳性率差异有统计学意义($P<0.01$),一致性也较差(Kappa 值分别为 0.107、0.081、-0.176)。见表 2。

3 讨论

EBV 是一种常见的病毒,VCA-IgM 是使用最早、也是文献报道中最常见的早期感染标志,但是由于儿童产生 VCA-IgM 的能力不足,VCA-IgM 阳性率偏低,仅检测 VCA-IgM 容易发生漏诊^[5]。因此,对 VCA-IgM 阴性的可疑样本需要进一步检测,VCA-IgG 亲和力检测和 EBV-DNA 是最主要的补充检测方法^[6-7]。VCA-IgG 亲和力检测发展时间较长,其诊断价值已得到公认,与 VCA-IgM 相同,也为早期感染指标。EBV-DNA 检测虽在临床检验中广泛应用,但关于 EBV-DNA 检测在儿童早期感染中诊断价值的研究结论并不完全一致^[8-9],因此此项检测尚需详细评价。

本研究的数据显示,EBV-DNA 和低亲和力 VCA-IgG 阳性率明显高于 VCA-IgM,与其他报道一致^[9-11]。EBV-DNA 和低亲和力 VCA-IgG 之间阳性率差异无统计学意义($P>0.05$),但是二者在不同年龄组之间分布规律则不同,低亲和力 VCA-IgG 阳性率在年龄 ≤ 4 岁组与年龄 >4 岁组之间差异有统计学意义($P=0.026$),而 EBV-DNA 阳性率在两年龄组之间差异无统计学意义($P>0.05$)。

进一步研究 3 者之间的一致性,结果显示,VCA-IgM 与 VCA-IgG 亲和力及 EBV-DNA 之间存在较弱的一致性(Kappa 值分别为 0.257、0.237),而 VCA-IgG 亲和力与 EBV-DNA 虽然阳性率较高,但欠缺有现实意义的一致性(Kappa=-0.009)。3 项检测结果的组合模式也证明了这一规律:单独 EBV-DNA 阳性及单独低亲和力 VCA-IgG 阳性标本分别占 EBV-DNA 阳性及低亲和力 VCA-IgG 阳性标本的比例高达 60.9%(28/46)、63.8%(37/58),VCA-IgG 低亲和力同时 EBV-DNA 阳性的样本仅 7 例。

以上数据表明 EBV-DNA 与传统早期诊断指标 VCA-IgM、VCA-IgG 亲和力检测有不同的临床意义。由于 EBV 感染后,会终生携带该病毒。病毒处于潜伏期的患者外周血白细胞中仍然会存在一定量的 EBV 核酸,EBV-DNA 用于 EBV 早期感染的诊断可能会存在假阳性,这也可能是 EBV-DNA 阳性率在年

龄 >4 岁组较高的原因。在 EBV 急性感染末期可产生 EBVEA-IgG、恢复期晚期产生 EBVNA-IgG(可终身存在),这两种抗体常为近期感染与既往感染的指标。为了分析造成 EBV-DNA 与 VCA-IgM、VCA-IgG 亲和力这 3 种检测差异过大的原因,本研究根据 VCA-IgG、EBVNA-IgG 及 EBVEA-IgG 将标本分为既往感染、近期感染、不确定感染阶段 3 组,分析 3 项检测指标在这 3 组中分布特征。结果显示,19 例既往感染患者中,没有 VCA-IgM 阳性及低亲和力 VCA-IgG 的标本,但存在 7 例 EBV-DNA 阳性标本,占有 EBV-DNA 阳性标本的 15.22%(7/46)。可见外周血白细胞 EBV-DNA 检测用于 EBV 早期感染的诊断的确受到潜伏病毒的影响,其特异性可能低于 VCA-IgM 和 VCA-IgG 亲和力检测。为克服这个问题,部分医院采用血浆作为 EBV-DNA 检测标本,陆海英等^[12]也报道血浆的检测结果显示与 VCA-IgM 相关性更好,但王克迪等^[13]在对血液病患者 EBV-DNA 载量的研究中则显示血浆检测结果与白细胞并无差异。血浆中 EBV-DNA 是否受到潜伏于白细胞中的 EBV 影响还需更多的研究。

在 9 例近期感染样本中,3 种抗体阳性率均较高,阳性率之间差异无统计学意义($P>0.05$),而且一致性也较好(VCA-IgM 与 VCA-IgG 低亲和力、VCA-IgM 与 EBV-DNA、EBV-DNA 与 VCA-IgG 低亲和力的 Kappa 值分别为 1.000、0.609、0.609);但在 108 例不能确定阶段的样本中,3 种抗体阳性率差异较大($P<0.01$),一致性也较差(Kappa 值分别为 0.107、0.081、-0.176)。有文献报道,VCA-IgM、低亲和力 VCA-IgG 及 EBV-DNA 在急性 EBV 感染病例中出现的时间不同,VCA-IgM 一般在急性症状期达高峰,4~8 周后消失^[4];EBV-DNA 一般在感染后 2 周左右达到高峰,之后迅速下降^[14];而低亲和力 VCA-IgG 抗体可能会存在相当长一段时间^[7]。由于临床标本往往单次采样,极有可能存在 EBV-DNA 已经出现而低亲和力 VCA-IgG 尚未出现或急性感染末期 EBV-DNA 已经低于检测下限而低亲和力 VCA-IgG 仍然存在。这也许是本研究中 EBV-DNA 与 VCA-IgG 亲和力检测不一致的另一原因。

综上所述,EBV-DNA 在急性 EBV 感染儿童中阳性率高于 VCA-IgM,与低亲和力 VCA-IgG 相近,但 EBV-DNA 与低亲和力 VCA-IgG 在不同样本中分布规律不一致,可能与其高峰浓度持续时间不同有关。目前,关于 EBV-DNA 与 VCA-IgG 亲和力一致性问题的报道较少,还需要严格研究进行确认。此外,EBV-DNA 也受到既往感染潜伏病毒的干扰,因此,单独依靠 EBV-DNA 诊断 EBV 急性感染可能还不够可靠,但是 EBV-DNA 作为目前临床常用的一种直接检测病毒成分的方法,其潜力是不容置疑的。

参考文献

[1] WOMACK J, JIMENEZ M. Common questions about in-

- fectious mononucleosis[J]. Am Fam Physician, 2015, 91(6):372-376.
- [2] XIONG G, ZHANG B, HUANG M Y, et al. Epstein-Barr virus(EBV) infection in Chinese children; a retrospective study of age-specific prevalence[J]. PLoS One, 2014, 9(6):e99857.
 - [3] HESS R D. Routine Epstein-Barr virus diagnostics from the laboratory perspective; still challenging after 35 years[J]. J Clin Microbiol, 2004, 42(8):3381-3387.
 - [4] 胡荣盛, 徐亚丽, 俞晓春, 等. 全血 EBV DNA 载量检测在儿童 EB 病毒感染中的应用价值[J]. 浙江医学, 2014, 36(9):766-769.
 - [5] CHAN K H, LUO R X, CHEN H L, et al. Development and evaluation of an Epstein-Barr virus(EBV) immunoglobulin M enzyme-linked immunosorbent assay based on the 18-kilodalton matrix protein for diagnosis of primary EBV infection[J]. J Clin Microbiol, 1998, 36(11):3359-3361.
 - [6] CHAN K H, NG M H, SETO W H, et al. Epstein-Barr virus(EBV) DNA in sera of patients with primary EBV infection[J]. J Clin Microbiol, 2001, 39(11):4152-4154.
 - [7] ROBERTSON P, BEYNON S, WHYBIN R, et al. Measurement of EBV-IgG anti-VCA avidity aids the early and reliable diagnosis of primary EBV infection[J]. J Med Virol, 2003, 70(4):617-623.
 - [8] JANANI M K, MALATHI J, APPASWAMY A, et al. A hospital based pilot study on Epstein-Barr virus in suspected infectious mononucleosis pediatric patients in India[J]. J Infect Dev Ctries, 2015, 9(10):1133-1138.
 - [9] 朱芹, 郭平, 黄雅娟, 等. EB 病毒血清学联合 DNA 定量检测在诊断婴儿传染性单核细胞增多症中的意义[J]. 中国现代医生, 2014, 52(11):56-58.
 - [10] 刘春梅, 张庆, 田文君, 等. EBV DNA 检测在小儿 EBV 感染相关疾病诊断中的意义[J]. 中华检验医学杂志, 2016, 39(4):256-261.
 - [11] AKPOLAT N, GEDIK M, NERGIZ S, et al. Determination of serological profiles and avidity of specific antibodies in the sera of patients with potential Epstein-Barr virus (EBV) infection[J]. Bratisl Lek Listy, 2013, 114(8):460-463.
 - [12] 陆海英, 魏秀琴, 徐小元, 等. EBV 抗体与 EBV DNA 水平的影响因素及其相关性分析[J]. 临床肝胆杂志, 2015, 31(5):766-770.
 - [13] 王克迪, 吕治, 王铁山, 等. 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[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(16):2161-2162.
 - [14] 杨细媚, 万祥, 辉段, 等. EBV-IgM、EBV-DNA 在传染性单核细胞增多症急性期的诊断意义研究[J]. 实用检验医师杂志, 2013, 5(4):233-235.

(收稿日期:2017-12-30 修回日期:2018-02-24)

(上接第 2440 页)

病毒相对容易^[10]。有试验证明, 标本提取核酸之前依次进行高速离心、过滤和酶处理 3 步法处理能够富集病毒粒子, 提高测序数据中病毒序列所占的比例^[11]。

测序过程一个重要的挑战是数据分析, 虽然有一些开放平台给研究者使用, 如 MetaVir 和 Vipie 可免费使用, 但是分析过程及等待时间均较长。因此, 各个实验室及科研平台应该建立适合自己的平台, 提高病原体检测速度。

参考文献

- [1] MOKILI J L, ROHWER F, DUTILH B E. Metagenomics and future perspectives in virus discovery[J]. Curr Opin Virol, 2012, 2(1):63-77.
- [2] KARLSSON O E, BELAK S, GRANBERG F. The effect of preprocessing by sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) on metagenomic detection of viruses[J]. Biosecur Bioterror, 2013, 11(S1):S227-S234.
- [3] TANG P, CHIU C. Metagenomics for the discovery of novel human viruses[J]. Future Microbiol, 2010, 5(2):177-189.
- [4] SAUVAGE V, GOMEZ J, BOIZEAU L, et al. The potential of viral metagenomics in blood transfusion safety[J]. Transfus Clin Biol, 2017, 24(3):218-222.
- [5] XU L, ZHU Y, REN L, et al. Characterization of the Nasopharyngeal Viral Microbiome from Children with Community-Acquired Pneumonia but Negative for Luminex xTAG Respiratory Viral Panel Assay Detection[J]. J Med Virol, 2017, 89(12):2098-2107.
- [6] ZHANG Q Y, XIAO F, GUI J F, et al. Complete genome sequence of lymphocystis disease virus isolated from China[J]. J Virol, 2004, 78(13):6982-6994.
- [7] 刘孝荣, 马东礼, 姜含芳, 等. 高通量测序方法在重症肺炎病原体检测的应用[J]. 中华检验医学杂志, 2017, 40(8):609-613.
- [8] DE VRIES M, MUNNINK B B, DEIJS M, et al. Performance of VIDISCA-454 in Feces-Suspensions and serum[J]. Viruses, 2012, 4(8):1328-1334.
- [9] SLEEMAN K, GUO Z, BARNES J, et al. R292K substitution and drug susceptibility of influenza A(H7N9) viruses[J]. Emerg Infect Dis, 2013, 19(9):1521-1524.
- [10] WYLIE K M, MIHINDUKULASURIYA K A, ERICA S, et al. Sequence analysis of the human virome in febrile and afebrile children[J]. PLoS One, 2012, 7(6):e27735.
- [11] HALL R J, WANG J, TODD A K, et al. Evaluation of rapid and simple techniques for the enrichment of viruses prior to metagenomic virus discovery[J]. J Virol Methods, 2014, 195(1):194-204.

(收稿日期:2017-12-04 修回日期:2018-02-18)