

EB病毒载量检测在相关疾病中标准化评价的进展

李友琼(综述), 覃桂芳(审校)

基金项目: 广西卫生厅科研项目(编号:桂卫 Z2010248)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院检验科

作者简介: 李友琼(1979-),男,医学硕士,主管技师,研究方向:EB病毒与恶性肿瘤的关系。E-mail:liyongqiong327@yahoo.com.cn.

通讯作者: 覃桂芳(1953-),女,大学本科,主任技师,研究方向:分子生物学检验与实验室管理。E-mail:qinguifang0512@yahoo.com.cn

[摘要] EB病毒属于人类疱疹病毒,与一些恶性肿瘤密切相关。EB病毒载量检测目前在临床中得到广泛应用,但是由于不同标本的类型、引物或探针、核酸的提取技术、使用的仪器、标准品和标准曲线、使用和报告的检测单位等影响,从而影响实验室间的比对。该文就这些影响EB病毒载量检测因素的标准化进行综述。

[关键词] EB病毒; 标准化; 载量

[中图分类号] R 373.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2011)12-1199-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.12.42

Evaluation of standardization of EB viral load testing in related diseases LI You-qiong, QIN Gui-fang. *Department of Laboratory Medicine, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China*

[Abstract] EB virus is the human herpes virus, closely related to some malignant tumours. EB viral load testing is currently widely used in the clinic, but due to the difference samples, or types of primer or probes, or nucleic acid extraction technology, or the use of equipment, or standards and standard curve, or reporting of test units, the inter-laboratory comparison were affected. In this paper, the impact factors of standardization of EB viral load testing were reviewed.

[Key words] EB virus; Standardization; Load

全世界超过90%的人感染有EB病毒(Epstein-Barr virus, EBV),这种疱疹病毒与一些恶性肿瘤密切相关,特别是淋巴细胞源性和上皮细胞源性的恶性肿瘤^[1,2]。虽然其致瘤机制未得到阐明,但是EBV仍被作为有效诊断和监测EBV相关肿瘤的标志物。血清或血浆病毒载量是指每毫升血清或血浆中病毒拷贝数,一般来说病毒DNA水平与病毒含量一致,所以病毒载量和病毒DNA水平意义相同,可以通过测定病毒基因组来测定病毒载量。近年来,自从在EB病毒相关肿瘤患者的血清或血浆中检测到游离的EB病毒DNA(Epstein-Barr virus DNA, EBV-DNA)后,相应的分子生物学定量检测方法就得到了很快的发展和运用。但是这类检测技术存在着一定缺陷,操作过程标准化的缺失使得质量保证体系没有良好地实施,同时由于不同的EBV相关肿瘤有着不同的临床和生物学特点,使得这类检测技术真正应用到临床,还需要处理好影响病毒载量检测的几个因素。

1 标本

对于EBV-DNA来源的认识,主要是来自对鼻咽癌患者血浆的研究。用DNA酶和超速离心的方法处理未分化鼻咽

癌患者的血浆,结果证实游离EBV-DNA不是作为病毒颗粒的组份而是以“裸”分子片段存在,这说明了从潜伏状态被激活后,EBV不是作为完整的病毒颗粒释放,而是作为一个肿瘤细胞凋亡过程释放出来的^[3,4]。正因为这样,所以许多学者和检测者选择血浆作为测定的标本。但是由于忽略了细胞相关病毒的存在和不可控的细胞裂解带来的复制或病毒DNA载量的高估,所以血浆也可能是监测EBV-DNA的不良临床标本^[5]。选择外周血单核细胞、血清、组织、全血、脑脊液、唾液甚至尿等^[6-12]作为检测的标本,存在的问题是不同类型的标本,不同类型的疾病,EBV-DNA检测到的含量并不一样,相互之间没有可比性,这不利于结果的判断。有报道鼻咽癌患者外周血白细胞可检测出EBV-DNA,且其阳性与病人治疗后是否复发、转移及生存率密切相关^[13],后来的研究却否认了这种观点^[14]。对于全血标本,我们还必须注意如何延长保存期或者合适地存放,以避免EBV-DNA从细胞中逃出造成血清或血浆的假阳性。有人认为肝素全血结合了所有可能锚住EBV的血细胞成份和最能反映患者血液循环系统中病毒的负荷,从而推荐其作为最佳的扩增标本^[5]。不

同的标本有诸多的影响因素,因而针对相同的 EBV 相关疾病,统一选择出比较合适的扩增标本类型,有利于结果判断和对比。几种 EBV 相关疾病,其病毒载量检测的标本选择总结如表 1^[15]。

表 1 EBV 相关疾病病毒载量检测的最佳标本

疾 病	病毒载量检测的标本		
	血浆或血清	单核细胞	全血
传染性单核细胞增多症	可取的	不推荐	不推荐
移植后淋巴增生性疾病	有争议的	可取的	较佳的
何杰金淋巴瘤	可取的	不推荐	ND
慢性激活 EBV 感染	用于预后的预测	不推荐	ND
鼻咽癌	可取的	不推荐	ND

注:ND 为没有或者较少资料报道的

2 扩增片段

目前虽然实时定量 PCR 方法很优越,但是仍有一个问题未能解决,那就是选择哪一个 EBV 基因片段扩增可以反映标本中 EBV 基因组的真正数目呢? 大多研究学者一般选择 BamHI-W 区片段作为扩增片段^[16-18],但是这一区域的片段是随机重复多次的,所以它也不能确切地反映在每个标本中 EBV 基因组真正的数目。而比较恰当的办法,还是选用能够代表 EBV 基因组单一拷贝的基因片段,比如潜伏膜蛋白 1、潜伏膜蛋白 2、核抗原 1 或聚合酶 1 等^[19-22]。在这些研究中,结果都提示选择这些片段有较高的精确性和特异性,结果之间的比较更加规范化。尤其是相对于其他片段,聚合酶 1 片段分析的方法最为准确^[22]。但是不同的 EBV 相关肿瘤有不同的 EBV 基因表达模式,这不利于扩增片段的选取,从而有人建议使用组成循环 EBV-DNA 的短 DNA 片段作为引物^[4,23]。目前市场上有商业的引物和探针出售,比如罗氏分子诊断学公司的潜伏膜蛋白 2 片段,德国 Qiagen 和 Bioactiva 诊断学公司、意大利 Amplimedical 公司的核抗原 1 片段等^[24-27]。这些商业试剂盒的推广,将促进 EBV-DNA 检测的规范化、标准化,增强实验室之间结果的对比。

3 技术方法

选择合适的扩增片段,也要选择合适的扩增方法,不同的扩增技术方法,由于方法的检测线性范围、扩增效率、精确度、操作要求和所需要的仪器都不同,那么得到的扩增数据结果也不同。早期的定性 PCR 或者半定量 PCR 检测范围较窄,精确度较低^[3],现在基本不使用。竞争定量 PCR 在扩增效率差异方面,虽然可以确定 2 到 4 倍的 EB 病毒载量,但是这种方法比较耗时,技术要求高,步骤多,因而未能广泛应用^[28]。实时定量 PCR 是通过荧光测定实时动态查看到扩增产物的拷贝数,以其反应迅速、精确性高、不易被污染和同时可以测试多个样本的优点取代了其他定量的 PCR 方法,被广泛应用于检测 EBV 载量。在实验室间进行实时定量 PCR 对比时,发现虽然有相似的结果趋势,但是还是存在一些误差^[29]。因此,需要探讨出实时定量 PCR 比较统一的标准化

操作规程。各种技术方法的优缺点总结如表 2^[15]。

表 2 EB 病毒载量检测的技术方法

方 法	特 点				缺 点
	敏感性	速率	处理	定量	
半定量 PCR	高	中等	中等	较差	准确性较差
竞争定量 PCR	高	中等	中等	好	耗时、费力
实时定量 PCR	高	快速	容易	好	仪器贵重

4 扩增仪

目前用于临床基因检测的扩增仪有很多品牌,其中比较常用的是罗氏和 ABI 公司的。每个品牌有好几种型号的扩增仪,型号不一样的扩增仪功能不同,扩增的效率也不一样。多中心进行罗氏 1.0 与 ABI7500、ABI7900 测试比较,结果显示线性范围、斜率、截距都不一样,虽然采用了共同的标准品,减少了一些跨区域的差异,但是国际间和实验室间的差异仍然是存在的^[29]。不同扩增仪之间存在差异,同种扩增仪由于采用不同的扩增体系、标准物或方法也存在差异。在罗氏同一型号扩增仪上分别设计不同的三个扩增方案,结果显示变异系数在 EB 病毒高载量标本中为 4% ~ 8%,在病毒中等载量标本中为 15% ~ 20%,在最低病毒载量检测水平标本中达到 22% ~ 47%^[24]。由于受到许多因素的影响,比如扩增标本来源、扩增片段的选取、扩增方案等,扩增的效率难以一致,所以很难去确定哪一种品牌的扩增仪或哪一种型号的扩增仪可以作为标准的扩增仪。

5 核酸提取

核酸进行定量分析,要求从标本中提取 EBV-DNA 的效率和纯度尽量高。定量结果是否准确,合适的病毒核酸抽取方法也起着至关重要的作用。临床标本来源各异,没有一种万能的抽取方法适合所有类型的标本。目前 EBV-DNA 的提取试剂有各自实验室配制的有机溶剂,也有商品试剂盒,用得比较多的品牌是 Qiagen^[17,21]。这种方法简单,用时少,提取的病毒载量比有机溶剂提取的高,但是对于提取病毒基因的过程中造成的损失或抑制鲜有研究报道^[21]。相同的标本和试剂盒,因采用不同的提取方法而其重复性有差异^[9]。对于各自实验室配制的有机溶剂,由于溶剂的质量、操作的要求等因素的影响,提取的效率会有较大偏差。通过使用统一的商品化试剂盒,按照其提供的说明书操作,在一定程度上来说,可以减少差异。而核酸提取效率的监控可以通过加入阳性对照序列或者扩增内源性的管家基因来实现。由于使用了内参品,得到的定量结果为相对定量,这比绝对定量的精确性更高、重复性更好。

6 标准品和标准曲线

实时定量扩增技术质量保证最为重要的一个因素是标准品的使用,通过标准品建立起来的标准曲线来判断扩增的结果。绝大多数对病毒进行实时定量的方法都是有赖于标准品的使用,定量结果的准确性很大程度上取决于标准品的准确性。对于目前应用的商品化试剂盒而言,在不同次试验

中,标准品浓度与荧光信号阈值循环的相关系数一般有很高的一致性。因此,使用标准品,不仅可以保证每次试验结果数据的精确性、准确性,而且也可以使各实验室间的结果具有可比性。用于制作标准曲线的标准品构建有两种方法,一种是直接以病毒颗粒或提纯的保守片段作为标准品,另一种则是以含待测目的片段构建的质粒作为标准品。用不同的细胞系或者片段克隆质粒来绘制 EBV 载量标准曲线,是目前 EBV 载量定量测定的一个局限性。较多研究采用的标准曲线是用 Namalwa 细胞系计算出来的,这种细胞系每个细胞中含有两个整合的 EBV 基因组^[17,21]。也有其他的研究者,采用的是 Raji、B95-8、P3HR1 细胞系^[5,20]或者核抗原 1 克隆的质粒^[30]。国内的学者大多采用的是 BamHI-W 片段的克隆质粒来绘制标准曲线^[14,31]。相较于病毒标准品,质粒标准品的最大优点是简便易行,但是大量数据表明,系列稀释度的质粒标准品并不能在全部线性范围内都与病毒核酸物质保持一致的性质,也没有涵盖待测标本可能出现的全部浓度范围。细胞和质粒的 DNA 可以有不同的提取和扩增效率,所以用不同来源的定标物来绘制标准曲线可能会产生不可比的结果。对于用哪一种细胞系或克隆质粒来做金标准,目前还没有统一的说法。现在也有一些国际公司或机构提供商品化的标准品,方便于每次实验的标定或进行实验室间的质量评比。因此,通过使用国际的公认标准品去标准化定量的 EBV-DNA 测定,是非常有必要的。

7 结果判断

病毒载量的最终定量是以某种标准来报告的,但是目前 EB 病毒载量检测结果的报告单位不尽相同,有拷贝/毫升、拷贝/毫克 DNA、拷贝/十万白细胞^[29,32,33]。国际上虽然制定有标准的国际计量单位,但这报告单位差异可能是由于标本来源的不同造成的。但是针对于同种来源的标本,必须统一规范使用结果报告单位。不同患者、不同的发病阶段和不同的疾病类型,相同数值的 EBV 载量可能表示不同的临床意义。比如鼻咽癌、传染性单核细胞增多症、移植后淋巴细胞增生性疾病、伯基特淋巴瘤等,相同的扩增数值在这些疾病中代表的临床意义肯定会不一样,在一种疾病中可能只是弱阳性,而在另一种疾病中已经是强阳性了,因为这与 EBV 在相关疾病中含量不同,或针对某一疾病其检测的敏感性和特异性所选取的临界值不同有关。因此,在不同疾病中,不能用相同的数值作为阳性结果判断标准,而应在同种疾病同种来源的标本中选择合适的数值作为结果判断的依据。

8 结语

虽然 EB 病毒载量检测已经应用于临床,但是对标本的类型、不同的引物或探针、核酸的提取技术、使用的仪器、标准品和标准曲线、使用和报告的检测单位等都没有形成国际共识,从而使实验结果难于进行比对。采用国际标准,结合优化的方法学,包括统一使用商业化的试剂和标本准备或预处理的自动化系统,为定量检测的发展起到重要作用,同时极大地便利于分子生物学定量检测技术的推广。但目前由于缺少国际标准,对于 EB 病毒载量检测的规范化、标准化还

需要进一步探讨。

参考文献

- 1 Macsween KF, Crawford DH. Epstein-Barr virus-recent advances [J]. *Lancet Infect Dis*, 2003, 3(3): 131-140.
- 2 Anderson M. EB dentistry—a third-party perspective [J]. *J Evid Based Dent Pract*, 2006, 6(1): 116-118.
- 3 Mutirangura A, Pornthanakasem W, Theamboonlers A, et al. Epstein-Barr viral DNA in serum of patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1998, 4(3): 665-669.
- 4 Chan KC, Zhang J, Chan AT, et al. Molecular characterization of circulating EBV DNA in the plasma of nasopharyngeal carcinoma and lymphoma patients [J]. *Cancer Res*, 2003, 63(9): 2028-2032.
- 5 Stevens SJ, Pronk I, Middeldorp JM. Toward standardization of Epstein-Barr virus DNA load monitoring: unfractionated whole blood as preferred clinical specimen [J]. *J Clin Microbiol*, 2001, 39(4): 1211-1216.
- 6 Chan KC, Leung SF, Yeung SW, et al. Quantitative analysis of the transrenal excretion of circulating EBV DNA in nasopharyngeal carcinoma patients [J]. *Clin Cancer Res*, 2008, 14(15): 4809-4813.
- 7 Baldanti F, Gatti M, Farione M, et al. Kinetics of Epstein-Barr virus DNA load in different blood compartments of pediatric recipients of T-cell-depleted HLA-haploidentical stem cell transplantation [J]. *J Clin Microbiol*, 2008, 46(11): 3672-3677.
- 8 Ryan JL, Morgan DR, Dominguez RL, et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in latently infected gastric adenocarcinoma [J]. *Lab Invest*, 2009, 89(1): 80-90.
- 9 Fafi-Kremer S, Morand P, Barranger C, et al. Evaluation of the Epstein-Barr virus R-gene quantification kit in whole blood with different extraction methods and PCR platforms [J]. *J Mol Diagn*, 2008, 10(1): 78-84.
- 10 Gaeta A, Verzaro S, Cristina LM, et al. Diagnosis of neurological herpesvirus infections: real time PCR in cerebral spinal fluid analysis [J]. *New Microbiol*, 2009, 32(4): 333-340.
- 11 Gregorek H, Jankowska I, Dzierzanowska-Fangrat K, et al. Long-term monitoring of Epstein-Barr virus DNA load and humoral parameter abnormalities in pediatric liver transplant recipients before development of malignancy [J]. *Pediatr Transplant*, 2010, 14(5): 629-635.
- 12 Mbulaiteye SM, Walters M, Engels EA, et al. High levels of Epstein-Barr virus DNA in saliva and peripheral blood from Ugandan mother-child pairs [J]. *J Infect Dis*, 2006, 193(3): 422-426.
- 13 Lin JC, Chen KY, Wang WY, et al. Detection of Epstein-Barr virus DNA in the peripheral-blood cells of patients with nasopharyngeal carcinoma: relationship to distant metastasis and survival [J]. *J Clin Oncol*, 2001, 19(10): 2607-2615.
- 14 张云, 鄱红艺, 冯惠霞, 等. 鼻咽癌病人血浆和外周白细胞 EB 病毒 DNA 定量分析 [J]. *中华医学杂志*, 2004, 84(12): 982-986.
- 15 Kimura H, Ito Y, Suzuki R, et al. Measuring Epstein-Barr virus (EBV) load: the significance and application for each EBV-associated disease [J]. *Rev Med Virol*, 2008, 18(5): 305-319.
- 16 Lo YM, Chan LY, Lo KW, et al. Quantitative analysis of cell-free

- Epstein-Barr virus DNA in plasma of patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer Res*,1999,59(6): 1188-1191.
- 17 Taylor DD, Gercel-Taylor C. Tumour-derived exosomes and their role in cancer-associated T-cell signalling defects[J]. *Br J Cancer*, 2005,92(2): 305-311.
- 18 Shao JY, Li YH, Gao HY, et al. Comparison of plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA levels and serum EBV immunoglobulin A/virus capsid antigen antibody titers in patients with nasopharyngeal carcinoma[J]. *Cancer*,2004,100(6): 1162-1170.
- 19 Lin JC, Wang WY, Chen KY, et al. Quantification of plasma Epstein-Barr virus DNA in patients with advanced nasopharyngeal carcinoma[J]. *N Engl J Med*,2004,350(24): 2461-2470.
- 20 Gandhi MK, Lambley E, Burrows J, et al. Plasma Epstein-Barr virus (EBV) DNA is a biomarker for EBV-positive Hodgkin's lymphoma [J]. *Clin Cancer Res*,2006,12(2): 460-464.
- 21 Bortolin MT, Pratesi C, Dolcetti R, et al. Clinical value of Epstein-Barr virus DNA levels in peripheral blood samples of Italian patients with undifferentiated carcinoma of nasopharyngeal type [J]. *Cancer Lett*,2006,233(2): 247-254.
- 22 Le QT, Jones CD, Yau TK, et al. A comparison study of different PCR assays in measuring circulating plasma Epstein-Barr virus DNA levels in patients with nasopharyngeal carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*,2005,11(16): 5700-5707.
- 23 Chan KC, Lo YM. Clinical applications of plasma Epstein-Barr virus DNA analysis and protocols for the quantitative analysis of the size of circulating Epstein-Barr virus DNA [J]. *Methods Mol Biol*, 2006, 336: 111-121.
- 24 Gulley ML, Fan H, Elmore SH. Validation of Roche LightCycler Epstein-Barr virus quantification reagents in a clinical laboratory setting[J]. *J Mol Diagn*,2006,8(5): 589-597.
- 25 Hill CE, Harris SB, Culler EE, et al. Performance characteristics of two real-time PCR assays for the quantification of Epstein-Barr virus DNA[J]. *Am J Clin Pathol*,2006,125(5): 665-671.
- 26 Perandin F, Cariani E, Pollara CP, et al. Comparison of commercial and in-house Real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus (EBV) DNA in plasma[J]. *BMC Microbiol*,2007,7: 22.
- 27 Ruiz G, Penña P, de Ory F, et al. Comparison of commercial real-time PCR assays for quantification of Epstein-Barr virus DNA[J]. *J Clin Microbiol*,2005,43(5): 2053-2057.
- 28 Stevens SJ, Vervoort MB, van den Brule AJ, et al. Monitoring of Epstein-Barr virus DNA load in peripheral blood by quantitative competitive PCR[J]. *J Clin Microbiol*,1999,37: 2852-2857.
- 29 Hayden RT, Hokanson KM, Pounds SB, et al. Multicenter comparison of different real-time PCR assays for quantitative detection of Epstein-Barr virus[J]. *J Clin Microbiol*,2008,46(1): 157-163.
- 30 Au WY, Pang A, Choy C, et al. Quantification of circulating Epstein-Barr virus (EBV) DNA in the diagnosis and monitoring of natural killer cell and EBV-positive lymphomas in immunocompetent patients[J]. *Blood*,2004,104(1): 243-249.
- 31 侯雪,张力,赵充,等. 血浆EB病毒DNA浓度预测鼻咽癌远处转移的研究[J]. *癌症*,2006,25(7): 785-792.
- 32 Hakim H, Gibson C, Pan J, et al. Comparison of various blood compartments and reporting units for the detection and quantification of Epstein-Barr virus in peripheral blood[J]. *J Clin Microbiol*,2007, 45(7): 2151-2155.
- 33 Tan EL, Looi LM, Sam CK. Evaluation of plasma Epstein-Barr virus DNA load as a prognostic marker for nasopharyngeal carcinoma[J]. *Singapore Med J*,2006,47(9): 803-807.

[收稿日期 2011-04-13][本文编辑 宋卓孙 刘京虹]

新进展综述

超声造影在乳腺肿瘤诊断中的应用

裴华洁(综述), 王小燕(审校)

基金项目: 广西科学研究与技术开发计划项目(编号:桂科攻0592007-2C)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院超声科

作者简介: 裴华洁(1983-),女,在读硕士研究生,研究方向:小器官及介入性超声。E-mail:peihuajie828@163.com

通讯作者: 王小燕(1957-),女,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:小器官及介入性超声。E-mail:ultrasoundwang@sina.com

[摘要] 超声造影技术是一种评价微循环血流灌注的新方法,其对乳腺肿瘤具有鉴别诊断的价值。该文就肿瘤血管的特点、超声造影成像技术的优越性以及超声造影在乳腺肿瘤中的应用作一综述。

[关键词] 超声造影; 肿瘤血管; 乳腺肿瘤

[中图分类号] R 737.9 [文献标识码] A [文章编号] 1674-3806(2011)12-1202-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2011.12.43