

论著·临床研究

儿童噬血细胞综合征与人微小病毒 B19 感染的相关性及临床特征分析

王颖超 刘冬杰 马丽娜 刘满菊 盛光耀 赵晓明

(郑州大学第一附属医院儿科 / 河南省高等学校临床医学重点学科开放实验室, 河南 郑州 450052)

[摘要] **目的** 探讨儿童噬血细胞综合征(HPS)与人微小病毒 B19(HPVB19)感染可能存在的相关性, 并对其临床特征进行分析。**方法** 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)和荧光定量 PCR 法对 65 例 HPS 患儿(HPS 组)及 65 例健康体检儿童(对照组)进行 HPVB19 IgM、IgG 及 HPVB19 DNA 检测, 并根据 HPVB19 DNA 检测结果将 HPS 患儿分为 HPVB19 感染组($n=14$)和非感染组($n=51$), 比较两组患儿临床资料。**结果** HPS 组 HPVB19-IgM 阳性率(26%, 17/65)显著高于对照组(9%, 6/65)($P=0.011$); 而 HPVB19-IgG 阳性率(38%, 25/65)与对照组(29%, 19/65)比较差异无统计学意义($P=0.266$)。HPS 组 HPVB19 感染率(22%, 14/65)明显高于对照组(3%, 2/65)($P=0.001$)。与 HPVB19 非感染组 HPS 患儿比较, 感染组患儿入院时血小板计数与血红蛋白水平显著降低, 肝功能损伤更严重, 发病时间更早, 病程迁延时间更长(均 $P<0.05$)。**结论** HPVB19 感染与 HPS 发病可能具有相关性。HPVB19 感染的 HPS 患儿起病更急, 临床表现更为严重, 病程迁延时间更长。
[中国当代儿科杂志, 2015, 17(1): 26-30]

[关键词] 噬血细胞综合征; 人微小病毒 B19; 临床特征; 儿童

Clinical features of childhood hemophagocytic syndrome and its association with human parvovirus B19 infection

WANG Ying-Chao, LIU Dong-Jie, MA Li-Na, LIU Man-Ju, SHENG Guang-Yao, ZHAO Xiao-Ming. Department of Pediatrics, The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China (Email: yingchaowang152@163.com)

Abstract: Objective To investigate the association of childhood hemophagocytic syndrome (HPS) with human parvovirus B19 (HPVB19) infection, and to analyze the clinical features of this disease. **Methods** ELISA and quantitative real-time PCR were used to detect HPVB19-IgM, HPVB19-IgG and HPVB19-DNA in 65 children with HPS (HPS group) and 65 healthy children (control group). The HPS group was divided into HPVB19-infected ($n=14$) and non-infected ($n=51$) groups according to the detection results of HPVB19-DNA. The clinical data of two groups were compared. **Results** The positive rate of HPVB19-IgM in the HPS group (26%, 17/65) was significantly higher than that in the control group (9%, 6/65) ($P=0.011$), and there was no significant difference in the positive rate of HPVB19-IgG between the HPS (38%, 25/65) and control groups (29%, 19/65) ($P=0.266$). The infection rate of HPVB19 in the HPS group (22%, 14/65) was significantly higher than that in the control group (3%, 2/65) ($P=0.001$). Compared with the non-infected group, the HPVB19-infected group had significantly lower platelet count and hemoglobin level on admission, significantly more severe liver function damage, a significantly earlier onset time, and a significantly longer course of disease ($P<0.05$). **Conclusions** The pathogenesis of HPS may be associated with HPVB19 infection. HPVB19-infected children with HPS have more acute onset, more severe clinical manifestations, and a longer disease duration.

[Chin J Contemp Pediatr, 2015, 17(1): 26-30]

Key words: Hemophagocytic syndrome; Human parvovirus B19; Clinical feature; Child

噬血细胞综合征 (hemophagocytic syndrome, HPS) 是一种多器官、多系统受累, 并进行性加重伴免疫功能紊乱的巨噬细胞增生性疾病, 该病起病急、病情进展迅速、病死率高。目前, 多数 HPS 患者发病原因尚不完全明确, 病毒感染在其发病中的作用是研究方向之一。有研究认为, 人微小病毒 B19 (human parvovirus B19, HPV B19) 与 HPS 关系密切^[1-2], 但国内少有报道, 本研究采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 和荧光定量 PCR 法对 HPS 患儿和健康儿童的外周静脉血血清标本进行 HPV B19-IgM、IgG 和 HPV B19-DNA 检测, 探讨 HPS 患儿与 HPV B19 感染的关系及临床特征。

1 资料与方法

1.1 研究对象

选取 2013 年 4 月至 2014 年 4 月于郑州大学第一附属医院收治入院的初诊为 HPS 的 65 例患儿为研究对象, 其中男 39 例, 女 26 例, 年龄 6 个月至 14 岁, 中位年龄 5.7 岁, 首发疾病诊断符合 2004-HLH 诊断指南^[3] 及 2009 年美国血液年会提出的修订指南^[4], 初诊病程 5~46 d, 所有 HPS 患儿均无其他家族遗传性疾病, 且临床资料完整; 同期选取在郑州大学第一附属医院行健康体检的儿童 65 例为对照组, 其中男 34 例, 女 31 例, 年龄 3 个月至 13 岁, 中位年龄 5.5 岁, 两组儿童在性别、年龄、生活地区分布等方面比较差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

1.2 HPV B19 感染的诊断标准

临床有 HPV B19 感染相关的症状, 并同时符合下列条件之一: (1) 特异性 HPV B19-IgM 抗体阳性, 并 HPV B19-DNA 阳性; (2) 特异性 HPV B19-IgG 由阴性转阳性或效价升高 ≥ 4 倍; (3) 定量 PCR 检测 HPV B19-DNA 阳性, 并达到 $>10^4$ IU/mL (6.5×10^3 基因量/mL) 或逐渐上升; (4) 骨髓或其他组织中 B19 病毒抗原阳性或检测出病毒颗粒。

1.3 标本采集

两组均于首次就诊时采集外周静脉血 2 mL 于普通干燥管中, 3400 r/min 离心 8 min, 留取血清, -20°C 保存, 待用于 ELISA 检测; 另用 EDTA 抗凝管采集外周静脉血 2 mL, 分离白细胞并固定

于载玻片上, 低温保存, 待用于荧光定量 PCR 检测。

1.4 ELISA 法检测血清 HPV B19-IgM 和 IgG 抗体

HPV B19-IgM 和 IgG ELISA 检测试剂盒分别购自德国 Virion 和 Serion 公司。操作步骤如下: 待测血清 1:100 稀释, 标准对照和阳性对照 1:10 稀释; 在相应孔中分别加入 100 μL 标准对照、阳性对照和待测血清样品; 37°C 孵育 60 min; 倒出孔中液体, 每孔加入 200 μL 稀释的洗涤液, 重复洗涤 3 次; 每孔中加入 100 μL 稀释的结合抗原; 37°C 孵育 60 min; 重复洗涤 3 次; 在每孔中加入 100 μL 底物液; $20\sim 25^\circ\text{C}$ 暗室中孵育 10 min; 在每孔中加入 100 μL 终止液; 30 min 内在微孔读数器 (B10-RAD Microplate Reader) 中读出 450 nm 处的 OD 值。结果判定以标准对照 B 的 OD 值为标准: >1.2 为阳性, <0.8 为阴性, $0.8\sim 1.2$ 为可疑阳性。

1.5 实时荧光定量 PCR 法检测 HPV B19-DNA

取样本 200 μL , 采用广州达安公司提取试剂盒提取并纯化样本中的 B19 DNA, 提取过程在罗氏 MagNA Pure LC 2.0 核酸提取仪上完成, 操作严格按照说明书进行。从 NCBI 上下载 HPV B19 核苷酸序列, 由上海生工生物工程公司设计并合成引物和探针: 上游引物 5'-GGGCCAATTGGAGGTATTAATC-3', 下游引物 5'-CCACCGTCCTGTAGCTTTACG-3', 片段长度为 117 bp; 探针 5'-Fam-TACTACCTTAGTTCAGTATGCTGTG-BHQ1-3'。实时荧光定量 PCR 检测试剂盒购自广州中山大学达安基因股份有限公司, 实验过程在 ABI Prism 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。反应体系为 60 μL , 包括模板 20 μL , 热启动 Taq 酶 0.4 μL , 尿 DNA 糖基化酶 (UNG) 0.5 μL , $1 \times$ PCR 缓冲液 5 μL , 上下游引物各 2.5 μL , 探针 0.5 μL , 200 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 4 μL , 5.0 mmol/L MgCl_2 5 μL , 灭菌蒸馏水补足体积至 60 μL 。反应条件为: 37°C UNG 反应 2 min; 50°C UNG 灭活 5 min; 94°C 预变性 10 min; 94°C 变性 10 s, 55°C 退火 35 s, 65°C 延伸 35 s, 共 45 个循环; 荧光信号层设定为 FAM 荧光素, 荧光信号采集设定在最后一步的 65°C 。PCR 结果判定: DNA 总含量 $<10^4$ IU/mL (6.5×10^3 基因量/mL) 为阴性, DNA 总含量 $>10^4$ IU/mL 为阳性。

1.6 统计学分析

应用 SPSS 17.0 统计学软件对数据进行统计学

分析,计数资料用率(%)表示,两组样本率之间的比较采用 χ^2 检验;当 $n \geq 40, 1 \leq$ 理论频数 <5 时,采用校正 χ^2 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV B19-IgM 和 HPV B19-IgG 检测结果

65例HPS患儿中,分别检测出17例HPV B19-IgM和25例HPV B19-IgG阳性患儿,阳性率分别为26%和38%;对照组65例儿童中,分别检测出6例HPV B19-IgM和19例HPV B19-IgG阳性者,阳性率分别为9%和29%,两组HPV B19-IgM阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=6.392, P=0.011$),而HPV B19-IgG阳性率在两组间差异无统计学意义($\chi^2=1.237, P=0.266$)。

65例HPS患儿中,同时检测出HPV B19-IgM和IgG均阳性者7例(11%),HPV B19总阳性率为54%(35/65);对照组65例儿童中,无

HPV B19-IgM和IgG同时阳性者,HPV B19总阳性率为38%(25/65),两组总阳性率比较差异无统计学意义($\chi^2=3.095, P=0.079$)。

2.2 HPV B19-DNA 检测结果

65例HPS患儿中,检测出HPV B19-DNA阳性14例,感染率为22%,其中HPV B19-IgM阳性13例,阴性1例;对照组65例儿童中,检测出HPV B19-DNA阳性2例,感染率为3%,且均为HPV B19-IgM阳性,两组HPV B19感染率比较差异有统计学意义($\chi^2=10.263, P=0.001$)。

2.3 不同检测结果 HPS 患儿的临床特征分析

根据HPV B19-DNA的检测结果将HPS患儿分为感染组和非感染组,与非感染组患儿比较,感染组患儿起病更急,血小板计数及血红蛋白含量明显下降,更易出现肝功能损伤,病程迁延时间更长(均 $P < 0.05$),而在年龄、脾肿大、中性粒细胞计数及血清铁蛋白水平等方面比较差异均无统计学意义(均 $P > 0.05$),见表1。

表1 不同检测结果 HPS 患儿的临床特征比较 [例(%)]

组别	例数	年龄 <6岁	脾肿大	NE $\leq 1.0 \times 10^9/L$	PLT $\leq 25 \times 10^9/L$	Hb $\leq 60 g/L$	ALT $\geq 80 U/L$	铁蛋白 $\geq 2000 ng/mL$	初诊病程 <2周	病程迁延 >2个月
非感染组	51	36(71)	44(86)	29(57)	5(10)	4(8)	30(59)	19(37)	21(41)	12(24)
感染组	14	9(64)	12(86)	7(50)	6(43)	5(36)	13(93)	6(43)	10(71)	9(64)
χ^2 值		0.016	0.147	0.209	6.347	5.007	4.264	0.146	4.030	6.584
P值		0.900	0.702	0.647	0.012	0.025	0.039	0.703	0.045	0.010

注:NE为中性粒细胞计数;PLT为血小板计数;Hb为血红蛋白;ALT为谷丙转氨酶。

3 讨论

HPV B19是在编号为B19的献血者血清标本中偶然发现的直径为20~25 nm的球形颗粒样病毒,由一线状单链DNA和衣壳构成,我国于1990年首次在西安应用病毒血清学方法证实国内存在此种病毒感染。近几年的研究发现,HPV B19感染的疾病谱在不断扩大,其致病性日益引起重视,现已证明儿童感染B19病毒可导致多种疾病,如传染性红斑(IE)、一过性再障危象、纯红细胞再生障碍性贫血^[5]、特发性血小板减少性紫癜(ITP)^[6]、关节炎^[7]、过敏性紫癜^[8](HSP)、粒细胞减少症、心肌炎^[9]、支气管炎、川崎病、单纯性红细胞发育不良等^[10],如果妊娠期受B19病毒感染,可致胎儿宫内死亡流产,或胎儿水肿贫血^[11]。现在国内

外对HPV B19是否是某些疾病的直接病原体还是特定疾病患者可以成为HPV B19易感人群尚未肯定。

HPS发病原因多样,起病急,病情进展迅速,死亡率高,需要及时行临床干预治疗。HPS根据不同病因分为两种类型:原发性HPS和继发性HPS。继发性HPS主要继发于感染、肿瘤、药物、结缔组织疾病等,尤其是病毒感染,其中EB病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、疱疹类病毒、肠道病毒、腺病毒等最多见^[12-15],原发性HPS可因感染而诱发。随着研究的深入,一些新的感染因素逐渐被大家认识,近年研究表明,HPV B19感染与HPS密切相关^[1-2,14]。

当前,确诊HPV B19感染的方法有血清学、组织学和分子生物学检测,以ELISA方法应用最

广泛。HPVB19 特异性 IgM 抗体阳性表示近期感染或急性感染,免疫功能正常的个体在感染 HPVB19 后 10~12 d 即产生特异性 IgM 抗体,持续 5 个月左右;特异性 IgG 抗体通常在感染后 15 d 产生,持续数月甚至终生,IgG 阳性表示既往感染,但其阳转或效价升高,是急性感染的指标。本研究结果提示:HPS 组患儿中 HPVB19-IgM 阳性率为 26%,显著高于正常对照组(9%),说明本组至少 26% 存在急性 HPVB19 感染,提示我国 HPS 患儿有较高的 HPVB19 感染率,HPVB19 感染与 HPS 发病可能具有相关性。HPS 组和正常对照组中 HPVB19-IgG 阳性率分别为 38% 和 29%,阳性率比较无明显差异。本研究中正常对照组 HPVB19 检测阳性率高于国内其他学者研究结果^[16],一方面说明我国儿童中 HPVB19 病毒感染率可能在逐年增高,另一方面可能与检测方法及受检测患儿合并有其他隐匿性感染有关。

考虑到某些免疫缺陷或抑制者,有时缺乏可检测到的特异性抗体反应,一般情况下,若仅依据 IgM 和 IgG 检测结果,诊断 B19 感染的结论尚有一定的局限性,因此对于 B19 病毒感染诊断最好行 PCR 检测。故本研究采用荧光定量 PCR 方法进一步行 HPVB19-DNA 检测,结果显示:HPS 组检测出 HPVB19-DNA 阳性 14 例,HPVB19-IgM 和 HPVB19-DNA 均阳性 13 例,HPVB19-IgM 阴性患儿中 HPVB19-DNA 阳性 1 例,根据 HPVB19 感染的诊断标准,感染率为 22%;明显高于对照组 HPVB19 的感染率(3%)。进一步分析 HPS 患儿的临床特征显示,14 例 HPVB19 感染组患儿中,初诊病程 <2 周者占 71%,PLT $\leq 25 \times 10^9/L$ 者占 43%,Hb $\leq 60 g/L$ 者占 36%,ALT $\geq 80 U/L$ 占 93%,病程迁延时间 >2 个月者占 64%,较 HPVB19 非感染组患儿有明显差异,提示 HPVB19 感染引起的 HPS 起病较急,临床表现较重,血小板和血红蛋白减低尤为突出,且较易出现肝功能损伤,病程迁延时间更长,而在年龄、脾肿大、中性粒细胞计数及血清铁蛋白水平等方面无明显差异。HPVB19 感染的临床表现多样,但是迄今为止,HPVB19 感染引起 HPS 的作用机制尚未完全明了,De Maria 等^[17]认为,受感染的红细胞成为吞噬细胞的靶细胞,可能是本病发生的机理之一;另一机理可能为干扰素- γ 及肿瘤坏死因子- α 等

细胞因子损害吞噬细胞系统的调控功能,导致全血细胞减少。总之,有关 HPVB19 感染引起 HPS 患者各种临床表现的机制有待进一步研究。

综上所述,HPVB19 在 HPS 患儿中有较高的感染率,HPVB19 感染与 HPS 发病可能具有相关性,HPVB19 可能加重 HPS 的某些临床症状,本课题组将用进一步前瞻性的研究方法来揭示其因果关系。本实验结果提示 HPVB19 协同其他感染因素可能加快 HPS 起病时间,并加重其血液系统及肝功能的损害,该结果仍需更多的实验证实。观察临床特征显示,HPVB19 感染诱发的 HPS 起病更急,血小板及血红蛋白减低更明显,且更易出现肝功能损伤,病情迁延时间相对较长,对此,本课题组将对 HPVB19 感染相关性 HPS 患儿进行随访,并扩大样本量,进一步分析其预后,以明确 HPVB19 感染与 HPS 的发病关系、临床特征及其预后。

对儿科常见疾病患儿尤其 HPS 患儿及早筛查 HPVB19,甚至将 HPVB19 检测列为常规检测项目之一,对病因分析以及避免交叉感染有重要临床意义。目前,HPVB19 感染相关性 HPS 尚无特异性治疗方法,加强抗病毒治疗及应用丙种球蛋白提高机体免疫力有利于提高临床治疗效果,并有助于预防并发相关 HPVB19 感染的其它疾病。

[参 考 文 献]

- [1] Tavera M, Petroni J, León L, et al. Reactive haemophagocytic syndrome associated with parvovirus B19 in a kidney-pancreas transplant patient[J]. *Nefrologia*, 2012, 32(1): 125-126.
- [2] Sood N, Yadav P. Hemophagocytic syndrome associated with concomitant Klebsiella and Parvovirus B-19 infection[J]. *Indian J Pathol Microbiol*, 2012, 55(1): 124-125.
- [3] Henter J, Horne A, Arico M, et al. HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2007, 48(2): 124-131.
- [4] Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis(HLH) and related disorders[J]. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2009: 127-131.
- [5] Gupta V, Saini I, Nath G, et al. Prevalence of parvovirus B 19 infection in children with aplastic anemia[J]. *Indian Pediatr*, 2013, 50(5): 489-491.
- [6] 张耀东, 胡群, 刘双又, 等. 人微小病毒 B19 感染与儿童特发性血小板减少性紫癜关系的 meta 分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2009, 11(12): 999-1001.
- [7] Carreño MÁ, Wainstein E, Abumohor P. Parvovirus B19 arthritis: Report of three cases[J]. *Rev Med Chil*, 2012, 140(11): 1453-1456.

- [8] Alonso-Ojembarrena A, Alvarez-Coca J, Pérez-García MJ, et al. Henoch-Schönlein purpura due to parvovirus B19[J]. *An Pediatr(Barc)*, 2006, 65(6): 641-642.
- [9] Molina KM, Garcia X, Denfield SW, et al. Parvovirus B19 myocarditis causes significant morbidity and mortality in children[J]. *Pediatr Cardiol*, 2013, 34(2): 390-397.
- [10] Mihály I, Trethon A, Arányi Z, et al. Observations on human parvovirus B19 infection diagnosed in 2011[J]. *Orv Hetil*, 2012 Dec, 153(49): 1948-1957.
- [11] Abiodun I, Opaleyee OO, Ojurongbe O, et al. Seroprevalence of parvovirus B19 IgG and IgM antibodies among pregnant women in Oyo State, Nigeria[J]. *J Infect Dev Ctries*, 2013, 7(12): 946-950.
- [12] 张景荣, 梁筱灵, 靳蓉, 等. HLH-2004 方案诊治儿童噬血细胞综合征临床分析 [J]. *中国当代儿科杂志*, 2013, 15(8): 686-688.
- [13] Canak G. Viral infection and hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Med Pregl*, 2013, 66(11-12): 448-451.
- [14] Goudarzipour K, Kajiyazdi M, Mahdaviyani A, et al. Epstein-barr virus-induced hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Int J Hematol Oncol Stem Cell Res*, 2013, 7(1): 42-45.
- [15] Hodnut FÖ, Ozcay F, Malbora B, et al. Severe adenovirus infection associated with hemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Turk J Haematol*, 2014, 31(1): 103-105.
- [16] 张国成. 儿童微小病毒 B19 感染的诊断与治疗 [J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(6): 459-463.
- [17] De Maria A, Zolezzi A, Passalacqua G, et al. Melkersson-Rosenthal syndrome associated with parvovirus B19 viraemia and haemophagocytic lymphohistiocytosis[J]. *Clin Exp Dermatol*, 2009, 34(8): e623-e625.
- (本文编辑: 万静)

· 消息 ·

“国际儿科肾脏病学会 (中国) 培训中心” 招募学员通知

北京大学第一医院儿 (肾) 科联合香港玛嘉烈医院青少年部是国内首家国际儿科肾脏病学会培训中心 (IPNA Training Center) ; 该中心主任为丁洁教授 (北京) , 副主任为谢纪超医生 (香港) 、肖慧捷主任医师 (北京) 、姚勇主任医师 (北京) 。按照 IPNA 规定, 学员在培训中心经过系统培训期满后, 经中心评估、IPNA 审查后可以获得“IPNA Fellow”的称号, 并享有 IPNA 给予的如下待遇: (1) 获得 IPNA 颁发的“IPNA Fellow”证书; (2) 获得 IPNA 赠送的一部 *Pediatric Nephrology* 专著; (3) 由 IPNA 资助 (免会议注册费, 提供交通费和食宿费) 参加一次亚洲或国内学术会议、或继续医学教育 (CME) 课程。

IPNA (中国) 培训中心 (北京 - 香港) 将于 2015 年继续招收培训学员, 预计招收 2~4 名学员, 培训时间约 9 个月 (部分培训在香港玛嘉烈医院青少年部进行) ; IPNA 将资助学员在培训期间的食宿费用、学员所在地至北京及北京至香港的往返机票。

申请者条件: 医学本科以上学历、有儿内科执业医师证书并有 3 年以上儿科临床工作经验、有一定英语基础的儿科医生。

申请程序: (1) 申请者将个人简历 (包括性别、年龄、学历、职称、英语水平以及肾脏领域的医、教、研经历和联系方式等) 、所在单位 (科室) 负责人和一位正高级职称医师的书面推荐信寄往北京大学第一医院儿 (肾) 科, 注意请在简历中表明申请目的 (本人或本单位的发展规划, 希望借助培训达到的目标等) ; (2) 培训中心将对申请者材料进行审核; (3) 获准学员的资料将被报送 IPNA 备案; (4) 由培训中心通知被批准学员具体事宜。

申请材料邮寄地址: 北京市西城区西安门大街 1 号, 北京大学第一医院儿科 (信封外面标注“IPNA 培训中心”字样) ; 邮编 100034; 收件人钟旭辉医师。申请截止日期为 2015 年 2 月 15 日。

联系人: 钟旭辉医师 (010-83572168; xuhui7876@126.com) 。

北京大学第一医院儿 (肾) 科
2014 年 9 月