

滁州地区女性人乳头瘤病毒感染状况及基因亚型分析

马贵凤

[摘要] **目的:**了解滁州地区女性人乳头瘤病毒(HPV)感染率、基因亚型及年龄特点。**方法:**采用 PCR-反向点杂交技术,对 2012 年滁州地区 7 家医院送检的 2 554 例女性患者宫颈分泌物或脱落细胞进行 HPV 23 种基因型检测。**结果:**2 554 例患者中共检出 HPV 阳性 557 例,感染率 21.81%,基因型 82 未检出。单一感染率 16.33%,双重感染率 3.92%,三重以上感染率 1.57%。阳性患者中高危型以 HPV16、58 和 52 型为主,低危型主要以 HPV43、81 型为主。23 种基因型中感染率前 5 位是 HPV16、58、43、52、81。感染的高峰年龄主要分布在 19~30 岁;HPV16 感染率 3.99%,HPV16 混合其他亚型感染率 1.61%;HPV16 感染主要分布在 61~70 岁;单一和三重以上感染的高峰年龄分布在 19~30 岁,双重感染高峰年龄分布在 51~60 岁。**结论:**滁州地区女性 HPV 感染以 HPV16、58 和 43 为主要的流行亚型,且 HPV 感染呈上升趋势,发病年龄趋于年轻化。

[关键词] 人乳头瘤病毒;宫颈肿瘤;基因亚型;PCR-反向点杂交技术

[中图分类号] R 373.9

[文献标志码] A

DOI: 10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.10.035

The infection of human papilloma virus and its analysis of genetic subtype among women in Chuzhou area

MA Gui-feng

(Hefei ADICON Clinical Laboratories Co. LTD, Hefei Anhui 230088, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the infection rate of human papillomavirus (HPV), its genotype and age characteristics among women in Chuzhou area. **Methods:** Twenty-three genotypes in cervical secretion or castoff cells in 2 554 women from Chuzhou area were detected using PCR-reverse dot blot. **Results:** Among 2 554 patients, 557 cases with positive HPV infection were detected, the infection rate of which was 21.81%, and the 82 genotype was not detected. The single infection, dual infection and more than triple infection rates of HPV were 16.33%, 3.92% and 1.57%, respectively. HPV16, 58 and 52 were the most prevalent types in the positive cases with high risk genotype, HPV43 and 81 were the most prevalent types in the positive cases with low risk genotype. Among 23 genotypes, the infection rates of HPV16, 58, 43, 52 and 81 were the first five in turn. The peak age of infection was mainly distributed in 19 to 30 years old women. The infection rates of HPV16 and HPV16 mixed with other subtypes were 3.99% and 1.61%, respectively. The peak ages of the infection of HPV16, single infection and more than triple infection of HPV, and dual infection were 61 to 70, 19 to 30 and 51 to 60 years old. **Conclusions:** The HPV16, 58 and 43 in HPV infection among women from Chuzhou area are the mainly popular subtypes, the HPV infection is on the rise, and the age of onset tends to be younger.

[Key words] human papillomavirus; cervical neoplasms; subgenotype; PCR-reverse dot blot

如今世界范围内宫颈癌在女性恶性肿瘤中居于第 2 位,其发病率仅次于乳腺癌。世界每年约有 50 万的宫颈癌新发病率,约占全部癌症新发病率的 5%,有 80% 发生在发展中国家,其中在中国约有 13 万。在我国,宫颈癌的发病率与死亡率均高于乳腺癌,是目前唯一一个病因明确的妇科恶性肿瘤,与高危型 HPV 的持续感染密切相关^[1-2]。HPV 呈球形,直径 52~55 nm,二十面体立体对称,无包膜,病毒基因组为超螺旋双链环状 DNA^[3]。目前鉴定出的人乳头瘤病毒(HPV)已超过了 200 种,约有 30 种基因型与生殖道黏膜感染相关^[4]。感染生殖道的

HPV 可分为 2 种:低危型和高危型。低危型主要引起肛门皮肤及男性外生殖器、女性大小阴唇、尿道口、阴道下段的外生殖性疣类病变和低度子宫颈上皮内病变,高危型除可引起外生殖器疣外,更重要的是引起外生殖器癌、宫颈癌及高度的子宫颈上皮内病变,而高危型 HPV16 和 HPV18 与宫颈癌的发生、发展有着密切的联系,是常见的性传播疾病的病原体^[5]。从高危型 HPV 的持续感染到一般的宫颈癌前病变并最终发展为宫颈癌需要 5~10 年。基于此,我们对安徽省滁州地区 7 家医院就诊的 2 554 例女性宫颈分泌物或脱落细胞进行 HPV 23 种基因型检测,旨在及时准确快速地检测 HPV 病毒,并进一步鉴定出基因型,为治疗、预防宫颈癌提供一定的理论依据。

[收稿日期] 2014-07-13

[作者单位] 合肥艾迪康临床检验所有限公司,安徽 合肥 230088

[作者简介] 马贵凤(1982-),女,技师。

1 对象与方法

1.1 研究对象 选择2012年滁州市7家医院送检的2 554例女性患者宫颈分泌物和脱落细胞。患者年龄19~80岁。

1.2 试剂和仪器 试剂盒:亚能生物技术(深圳)有限公司生产;基因扩增仪:亚能生物 BIOER;分子杂交箱:COMBi-H12。

1.3 标本采集

1.3.1 检查前准备 患者月经来潮后10~18 d为最佳检查时间,要求患者检查前3 d内禁作阴道冲洗,禁用避孕药膏等阴道内用药,检查前24 h内禁止性行为,检查禁行醋酸或碘液涂抹。

1.3.2 采样方法 以专用宫颈脱落细胞采集器进行采样。医护人员先以窥阴器或阴道张开器暴露宫颈,用棉拭子将宫颈口过多的分泌物擦去。取出宫颈刷置于宫颈口,单方向旋转4~5周以获得足量的上皮细胞样本,然后将宫颈刷头部放入洗脱管中,沿刷柄折痕处将宫颈刷柄折断,旋紧洗脱管盖,做好样本的标识,并保持洗脱管直立放置,标本一经采集,冰壶或泡沫箱加冰袋或干冰密封运输(8 h内可接受常温运输)送往本所PCR室2~8℃保存,24 h内进行检测。

1.4 检测原理和程序

1.4.1 检验原理 试剂盒采用PCR体外扩增和DNA反向点杂交相结合的DNA芯片技术。利用HPV的基因特点设计特异引物,可以扩增出23种HPV基因型的目标片段,再将扩增产物与固定在膜条上包括18种高危型和5种低危型在内的分型探针进行杂交,依据杂交信号的有无来判断是否有HPV基因型的存在。

1.4.2 检测程序

1.4.2.1 HPV-DNA的提取 充分洗脱宫颈刷,取1 ml洗脱液转移到1.5 ml离心管中,13 000 r/min离心10 min,弃去上清液,保留管底的细胞沉淀。加入50 μl裂解液悬浮沉淀,金属浴100℃加热10 min。13 000 r/min离心10 min,保留上清液待用。

1.4.2.2 PCR扩增 取出PCR反应管(20 μl),加入已提取的HPV-DNA 5 μl,每次实验设置阴性和阳性质控各1个,把加好的反应管放入扩增仪内。

按以下条件进行扩增:50℃ 15 min;95℃ 10 min;94℃ 30 s;42℃ 90 s;72℃ 30 s;72℃ 5 min;共40个循环。

1.4.2.3 杂交 取15 ml塑料离心管,放入标有样

本编号的膜条,加入A液(2×SSC,0.1% SDS)5~6 ml及所有(25 μl)的PCR产物,将盖稍拧紧,再将离心管放入沸水浴中加热10 min,取出,拧紧管盖,放入杂交箱51℃杂交1.5 h。取50 ml塑料离心管,加入50 ml B液(0.5×SSC,0.1% SDS),于杂交箱中预热至51℃备用。

1.4.2.4 洗膜与显色 取出膜条,移至装有预热B液的50 ml离心管中,于51℃轻摇洗涤5 min。再取出膜条放入配制好的悬浮液(A液:POD=2 000:1)中,室温轻摇孵育30 min,弃去孵育液。用A液室温轻摇洗2次,每次5 min。用C液(0.1 mol/L枸橼酸钠)室温洗膜1~2 min,同时配制显色液(C液19 ml+TMB 1 ml+30% H₂O₂ 2 μl)。将膜条浸泡于显色液中避光显色30 min,转移至去离子水中浸泡后观察结果。

1.5 结果判定 高危型HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、73、82、83;低危型HPV6、11、42、43、81;PC为显色质控点。依据斑点显现的有无判读结果,依据蓝色斑点显现的位置即可定HPV基因型(见图1~3)。

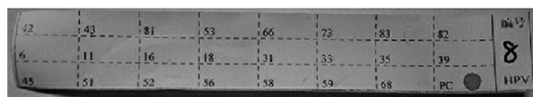


图1 阴性结果

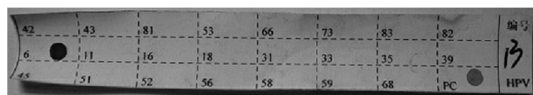


图2 单一基因型感染(HPV6+)

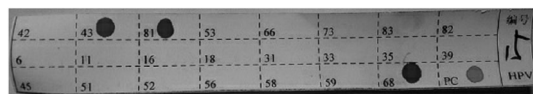


图3 多基因型混合感染(HPV43+, HPV81+, HPV68+)

1.6 结果比对 对HPV16和HPV18阳性的标本进行荧光PCR检测,将结果比对确证。收集在PCR-反向点杂交法技术中HPV16、18阳性标本10个保存于-20℃冰箱,集中进行荧光PCR检测,试剂盒由爱康生物技术有限公司提供。检测原理:选用HPV E1区作为扩增区域,设计特异引物及特异Taqman探针,并结合FQ-PCR技术,通过荧光自动PCR仪(ABI7300)实现在全封闭反应体系中进行HPV16/18型核酸扩增和检测,检测结果显示10个标本均为阳性。

1.7 统计学方法 采用本实验室内部LIMS系统建立数据库,由实验室专业人员双录入资料,实验室内部LIS系统进行数据统计,并且用Excel将统计的数据整理分析。

2 结果

2.1 HPV 感染率 2 554 名女性中共检出 HPV 阳性 557 例,感染率 21.81%,除高危型 HPV82 未检出,其他 22 种基因型均检出。单一感染 417 例(16.33%);双重感染 100 例(3.92%);三重以上感染 40 例(1.57%)。557 例阳性标本中高危型以 HPV16 为主,高危型感染率依次为: HPV16 (144/5.64%), HPV58 (81/3.17%), HPV52 (60/2.35%), HPV56 (41/1.61%), HPV31 (40/1.57%), HPV18 (33/1.29%), HPV33 (31/1.21%), HPV35 (26/1.02%), HPV68 (22/0.86%), HPV66 (22/0.86%), HPV59 (15/0.59%), HPV53 (11/0.43%), HPV45 (7/0.27%), HPV83 (5/0.20%), HPV51 (3/0.12%),

HPV73 (2/0.08%), HPV39 (1/0.04%);低危型以 HPV43 型为主,低危型感染率依次为 HPV43 (69/2.70%), HPV81 (48/1.88%), HPV11 (38/1.49%), HPV6 (30/1.17%), HPV42 (18/0.70%)。

2.2 HPV 感染一般情况及年龄分布 本结果显示,23 种基因型中感染率前 5 位主要是 HPV16、58、43、52、81。减去 2 554 例患者中的 72 例年龄不详者,在 2 482 份患者的分泌物标本中,感染的高峰年龄主要分布在 19~30 岁(见表 1); HPV16 感染率 3.99%, HPV16 混合其他亚型感染率 1.61% (见表 2); HPV16 感染率主要分布在 61~70 岁;单一和三重以上感染的高峰年龄分布在 19~30 岁,双重感染高峰年龄分布在 51~60 岁(见表 3)。

表 1 滁州地区各年龄人群 HPV 前 5 位基因亚型感染率 (%)

年龄/岁	人口数	HPV16		HPV58		HPV43		HPV52		HPV81	
		阳性数	感染率	阳性数	感染率	阳性数	感染率	阳性数	感染率	阳性数	感染率
19~30	353	20	5.67	12	3.40	16	4.53	8	2.27	9	2.55
31~40	718	40	5.57	21	2.92	7	0.97	13	1.81	5	0.70
41~50	1 068	63	5.9	34	3.18	28	2.62	23	2.15	21	1.97
51~60	228	10	4.39	8	3.51	10	4.39	7	3.07	8	3.51
61~70	73	6	8.22	0	0.00	1	1.37	3	4.11	0	0.00
71~80	42	0	0.00	2	4.76	3	7.14	1	2.38	1	2.38
合计	2 482	139	5.60	77	3.10	65	2.62	55	2.22	44	1.77

表 2 各年龄人群 HPV16 感染率、HPV16 混合其他基因亚型感染率和 HPV 总感染率 (%)

年龄/岁	人口数	HPV16		HPV16 混合感染		HPV 总感染	
		阳性数	感染率	阳性数	感染率	阳性数	感染率
19~30	353	13	3.68	7	1.98	94	26.63
31~40	718	30	4.18	10	1.39	134	18.66
41~50	1 068	44	4.12	19	1.78	234	21.91
51~60	228	8	3.51	2	0.88	50	21.93
61~70	73	4	5.48	2	2.74	14	19.18
71~80	42	0	0.00	0	0.00	6	14.29
合计	2 482	99	3.99	40	1.61	532	21.43

表 3 各年龄人群 HPV 总感染率 (%)

年龄/岁	人口数	单一感染		双重感染		三重以上感染	
		阳性数	感染率	阳性数	感染率	阳性数	感染率
19~30	353	62	17.56	19	5.38	13	3.68
31~40	718	109	15.18	16	2.23	9	1.25
41~50	1 068	176	16.48	44	4.12	14	1.31
51~60	228	34	14.91	13	5.7	3	1.32
61~70	73	10	13.7	4	5.48	0	0.00
71~80	42	4	9.52	1	2.38	1	2.38
合计	2 482	395	15.91	97	3.91	40	1.61

3 讨论

3.1 HPV 基因型感染与分布 本研究统计结果显示, HPV 感染率 21.81%, 基因型感染率前五位依次为 HPV16、58、43、52、81, 与某些地区感染率相近, 但前 5 位基因亚型有所不同。如常州地区 HPV 感染率 21.10%, 基因型为 HPV16、58、33、18、31^[6]; 成都市龙泉驿区 HPV 总感染率 21.10%, 基因型为 HPV52、58、16、33、68^[7]。滁州地区 HPV 感染率明显低于其他一些地区, 如: 合肥地区感染率 46.6%,

主要的基因型为 HPV16、52、33、58/11、18^[8]; 甘肃地区感染率 29.5%, 主要的基因型为 HPV16、52、58、31、18^[9]; 贵州省部分地区感染率 30.31%, 主要的基因亚型为 HPV16、52、18、58、11^[10]; 上海地区感染率 28.60%, 主要的基因亚型为 HPV52、16、58、53、11^[11], 分析原因可能为地域、文化、经济和生活习惯的差异。

3.2 HPV 感染与年龄关系 HPV 传播主要通过直接接触感染者的病变部位或间接接触被病毒污染的物品。生殖道感染与性行为关系密切, HPV 引起的生殖道感染是性传播疾病之一, HPV 阳性率与性伙

伴数量及初次性行为的年龄均呈正相关^[4]。本研究显示,HPV感染年龄主要集中在19~30岁,其次是41~60岁,71岁以上感染率最低,HPV感染趋于年轻化。在中国,自20世纪80年代初以来,从尖锐湿疣发病率看,临床上HPV感染呈上升趋势,且宫颈癌发病年龄趋于年轻化。随着中国经济飞速发展,人们的性观念也趋于开放,最近一项调查^[12]结果显示:在校大学生性与生殖健康知识知晓率低,性观念比较开放。

本研究数据统计对滁州地区宫颈癌防治和流行病统计工作具有一定意义。笔者建议可以应用HPV16/18二价疫苗针对已婚女性进行预防接种,并将HPV检测纳入女性人群每年正常体检内容之中,提倡有关部门对适龄女性进行性与生殖健康卫生知识的普及,特别是高校对大学生相关知识的教育宣传。关爱女性健康,做到早预防、早发现、早治疗,降低宫颈癌的发病率。

[参 考 文 献]

- [1] 黄立强,王淑青. 重视宫颈癌前病变的防治[J]. 中国保健营养,2013,23(1):53-54.
- [2] Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics,2002[J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2):74-108.

- [3] 李凡,刘晶星. 医学微生物学[M]. 7版. 北京:人民卫生出版社,2012:317-319.
- [4] 吕行,犹忆,关思宇,等. 宫颈癌危险因素 Meta 分析[J]. 现代预防医学,2011,38(22):4596-4598.
- [5] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2007:240-253.
- [6] 朱自强,王秋伟,黄瑞萍,等. 常州地区妇女 HPV 感染状况调查[J]. 现代生物医学进展,2011,11(10):1934-1936.
- [7] 叶德华. 成都市龙泉驿区女性宫颈 HPV 感染型别分布[J]. 四川医学,2013,34(1):144-146.
- [8] 齐丽敏,凌斌,冯定庆,等. 合肥地区 506 例子宫颈人乳头瘤病毒感染情况分析[J]. 中国临床保健杂志,2010,13(2):141-144.
- [9] 周庆云,田芳,杜敏,等. 甘肃地区女性宫颈 HPV 感染基因亚型分布状况[J]. 卫生职业教育,2010,28(23):124-126.
- [10] 孙丽君,娄雪玲,王东红,等. 贵州省部分地区妇女宫颈人乳头瘤病毒感染现状调查及分析[J]. 中国综合临床,2009,25(9):923-927.
- [11] 李江燕,陈洁,侯晓青,等. 上海地区妇女宫颈脱落细胞中人乳头瘤病毒型别分布特征[J]. 现代免疫学,2012,32(2):148-151.
- [12] 吴敏,吴颖岚,方超英,等. 某高校大学生性与生殖健康知识状况调查分析[J]. 医学临床研究,2014,31(2):251-254.

(本文编辑 刘畅)

[文章编号] 1000-2200(2015)10-1398-03

· 检验医学 ·

东芝 TBA-120FR 型与日立 7080 型全自动生化分析仪检测结果的比较

石 巍¹,严开斌¹,李红林²

[摘要]目的:比对并分析东芝 TBA-120FR 型与日立 7080 型全自动生化分析仪检测结果,评价 2 台仪器检测结果的一致性。**方法:**以参加省室间质评成绩优秀的日立 7080 型全自动生化分析仪检测系统为参比检测系统(X),东芝 TBA-120FR 型全自动生化分析仪检测系统为实验检测系统(Y),参考美国临床实验室标准化委员会的 EP9-A2 文件的要求连续 5 d 共选取 40 份血清标本(包含高、中、低值)进行 8 个项目的检测,并对检测结果进行直线相关与回归分析,计算医学决定水平处的系统偏差,以美国临床实验室修正法案(CLIA)'88 规定的允许误差的 1/2 为标准,判断其结果的一致性和可比性。**结果:**2 种型号生化分析仪 8 个项目检测结果的相关系数均 >0.975,相关性良好,在医学决定水平处的系统偏差除白蛋白、总胆固醇在低值处的相对偏差 >1/2 CLIA'88(%)允许误差,不可接受外,其余都 <1/2 CLIA'88(%)允许误差,可被接受。**结论:**同一实验室有 2 台或 2 台以上的生化分析仪开展相同检测项目时,应定期进行比对试验,以实现不同检测系统检测结果的一致性。

[关键词] 生化分析仪;可比性;比对试验

[中图分类号] R 446.12

[文献标志码] A

DOI:10.13898/j.cnki.issn.1000-2200.2015.10.036

[收稿日期] 2013-05-11

[作者单位] 1. 江苏省洪泽县人民医院 检验科,223100;2. 南京医科大学附属淮安第一医院 检验科,江苏 淮安 223300

[作者简介] 石 巍(1977-),男,主管检验技师。

随着临床医学检验技术的飞速发展,越来越多的医院检验科拥有 2 台或 2 台以上的全自动生化分析仪,如何保证不同品牌或同品牌不同型号的全自动生化分析仪之间检测结果的一致性和可比性,日益成为医学检验工作者需要高度重视的问题。实验室认可的 2 个国际标准 ISO/IEC17025(检测和校准