

相应的效价为 1 : 25 600,此效价比较理想,可用于一般实验的使用,如凝集反应试验,沉淀反应试验及相关的免疫学诊断^[5-6]。

3.3 本实验经济实用,适合于初学者学习制备抗血清。本法还可用于检测血清中各种免疫球蛋白、甲胎蛋白、乙型肝炎表面抗原。

3.4 在利用双向扩散试验检测抗体时,需要时间较长,而且灵敏度不够高,可以用免疫电泳试验来替代抗体的检测,提高效率与灵敏度^[7-8]。

3.5 ELISA 法试验灵敏度高,特异性好,在临床上得到广泛应用^[9]。但是在操作中各环节对试验检测效果影响较大,如不注意,将会导致显色不全、花板等结果。

参考文献

[1] 徐军发. 不同免疫扩散[J]. 临床免疫学检验实验,2010,8(6):31-32.
[2] 吕世静. 抗原和抗体的制备[J]. 临床免疫学检验实验,2010,1

(2):88-90.
[3] 盘箐,李贝晶. 动物免疫血清的制备[M]. 中国当代医药,2009,16(24):233-235.
[4] 英信,李红花,李芳芳,等. 不同免疫途径对制备抗血清影响的探讨[J]. 现代预防医学,2010,37(6):1106-1107.
[5] 莫链杰,陈晨,胡希文,等. 不同免疫程序制备兔抗牛血清清蛋白抗血清的效价比较[J]. 健康研究,2009,2(19):95-97.
[6] 吴震杰,蔡玲斐,王金鑫,等. 不同免疫程序制备伤寒抗血清的效价比较[J]. 杭州师范学院学报:医学版,2007,27(5):317-318.
[7] 陈燕飞. 抗原与免疫血清的制备[J]. 长治医学院学报,2006,23(2):17.
[8] 朱振久,张冉,杨惠军,等. 短程免疫法制备高效价抗血清研究[J]. 湖南师范大学学报:医学版,2006,1(6):67-69.
[9] 蔡玲斐. 不同免疫途径制备伤寒抗血清效价的比较[J]. 杭州医学高等专科学校学报,2002,23(3):106-107.

(收稿日期:2011-03-28)

• 检验技术与方法 •

膜杂交多重检测技术在 HPV 基因分型中的应用

王文强,龙 丹,胡庆宏,易诚予,骆长玲
(南昌大学附属第一医院 330006)

摘要:目的 应用膜杂交多重检测技术进行人乳头瘤病毒(HPV)基因分型诊断,以了解 HPV 亚型的感染状态。方法 采用膜杂交多重检测技术对 2 322 例患者进行 21 种 HPV 基因亚型检测。结果 共检出 HPV 感染者 952 例,阳性率为 40.99%。其中高危型感染 795 例,占 83.5%;低危型感染 157 例,占 16.5%;混合感染 309 例,占总阳性的 32.46%;单个亚型感染数为 643 例,占 67.54%,其中最常见 3 种亚型是 52、16 和 58 型,分别为 131 例(20.37%)、110 例(17.11%)和 76 例(11.82%)。不同年龄组的 HPV 感染检出率差异明显,小于 20 岁、20~35 岁、35~50 岁和大于 50 岁的 HPV 感染检出率分别为 3.8%、48.7%、42.9%和 4.6%,各年龄组低危型和高危型感染阳性率分别为 1.6%和 2.2%、17.5%和 31.2%、10.8%和 32.1%、0%和 4.6%。结论 膜杂交多重检测技术在 HPV 感染基因分型中的应用具有高度特异性和敏感性,可以为临床 HPV 感染诊断和宫颈癌的监测及预防提供可靠的实验依据。

关键词:基因型; 人乳头瘤病毒; 宫颈肿瘤; 膜杂交; 多重检测
DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.18.030 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-4130(2011)18-2110-02

宫颈癌是仅次于乳腺癌的最常见的妇科恶性肿瘤之一,近年来,我国宫颈癌发病率和死亡率逐渐上升,并趋于年轻化,因此越来越受到人们的重视。目前宫颈癌是人类所有癌症中惟一病因明确的癌症,即人乳头瘤病毒(human papilloma virus, HPV)的感染是宫颈癌发生的必要条件和主要病因^[1-2]。几乎所有的宫颈癌患者体内都检测到 HPV,从 HPV 感染到宫颈癌的发生需要经过多年甚至数十年的时间,如能早期发现、早诊断和治疗,就可将宫颈癌的发病率降到最低,甚至可能杜绝宫颈癌的发生。目前已发现了 100 多种 HPV 亚型,其中至少有 40 多种亚型与宫颈病变密切相关,且不同亚型致病能力、引起宫颈病变的病理性质有所不同。其中高危型 HPV 的持续感染是宫颈上皮内高度病变和宫颈癌发生的主要病因,这些高危型 HPV 主要包括 HPV16、18、31、33、35 等^[2];而低危型 HPV(如 HPV6、11、42 等)则常引起外生殖器湿疣等良性病变和宫颈上皮低度病变。因此,对 HPV 的分型检测是预防宫颈癌和早诊早治的重要手段。现应用膜杂交多重检测技术对患者进行了 HPV 分型检测,并对其各亚型感染情况、年龄组分布进行了分析。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2 322 例临床标本均为 2009 年 1 月 1 日至

2010 年 3 月 31 日期间到该院门诊就诊的不同年龄段女性,年龄为 17~83 岁,均用棉拭子擦取宫颈处的表皮脱落细胞。
1.1.2 仪器与试剂 检测试剂盒由凯普生物化学(潮州)有限公司提供,每张膜条可同时检测低危型 HPV6、11、42、43、44 和高危型 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、CP8304 亚型。基因扩增仪为美国 ABI 公司 PE-5700 型(使用 9600 模式)荧光定量扩增仪,杂交仪为香港基因科技有限公司 HHM-2 型凯普医用核酸分子快速杂交仪。
1.2 方法 将含有保养液的棉拭子混匀,取 800 μL 转移到 1.5 mL 的微量 EP 管中,12 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,按试剂说明书进行 DNA 提取,即得 DNA 提取液备用。在 PCR 反应管中加入已提取的待测样品 1.2 μL,反应体系 25 μL。按以下条件进行扩增:20 ℃ 10 min,95 ℃ 9 min 变性;95 ℃ 20 s,55 ℃ 30 s,72 ℃ 30 s 共 40 个循环,最后延伸 72 ℃ 5 min。杂交条件为:取 PCR 产物 20 μL 在 95 ℃加热 5 min,立即冰浴 2 min 以上,于 45 ℃进行杂交试验,每步均严格按试剂说明书操作。每批次均取试剂盒内提供的阳性标本做对照。
2 结 果
2.1 2 322 例患者共筛查出 HPV 亚型阳性标本 952 例,阳性率 40.99%。在所有 HPV 感染者中,高危型感染 795 例,其中

检出率最高的 3 种亚型分别为 52、16 和 58 型;低危型感染 157 例,其中检测率最高的 3 种亚型分别是 11、6 和 44 型。见表 1。

表 1 952 例感染者 HPV 亚型分布情况

型别	例数(n)	检出率(%)	型别	例数(n)	检出率(%)
低危型	6	6.51	39	33	3.47
	11	7.55	45	11	1.45
	42	1.02	51	17	0.41
	43	0.21	52	231	24.26
	44	1.15	53	93	9.71
高危型	16	21.85	56	21	2.20
	18	8.19	58	148	15.14
	31	5.56	59	21	2.20
	33	11.34	66	37	3.88
	35	0.63	68	59	6.20
			CP8304	84	8.82

2.2 对所有 HPV 感染者按不同年龄进行分组,HPV 感染者主要是 21~50 岁年龄段,占有感染者的 91.6%。20 岁以下的青少年及 50 岁以上的老年人感染率较低,但值得注意的是,50 岁以上的老年人感染的 HPV 均为高危型,需引起重视。见表 2。

表 2 952 例 HPV 亚型感染阳性率年龄分布情况

年龄	低危型例数(%)	高危型例数(%)	总阳性例数(%)
<20 岁	15(1.6)	21(2.2)	36(3.8)
21~35 岁	67(17.5)	297(31.2)	464(48.7)
36~50 岁	103(10.8)	305(32.1)	408(42.9)
>50 岁	0(0)	44(4.6)	44(4.6)

2.3 对每例感染者的 HPV 感染情况进行分析,HPV 的感染以单亚型感染为主,但同时存在 32.46%的混合感染病例。在混合感染的患者中,以 2 种亚型混合感染最常见,为 202 例(21.22%),其次为 3 种亚型感染 90 例(9.45%),3 种以上亚型感染者少见,为 17 例(1.79%),检出率最高的 3 种亚型与单亚型感染患者中的情况一致,均为 52、16 和 58 型。但通过对 2 个感染群体检出率的对比分析发现,检出率最高的这 3 种亚型在混合感染者中的检出率(87.38%)较在单亚型感染者中(49.30%)明显较高。在混合感染者中,单纯高危型混合感染患者为 575 例,占 60.40%,单纯低危型感染为 68 例,占 7.14%,高、低危型混合感染 309 例,占 32.46%。见表 3。

表 3 HPV 单亚型感染分布情况

型别	例数(n)	检出率(%)
高危型	575	60.40
低危型	68	7.14
混合型	309	32.46
2 种亚型	202	21.22
3 种亚型	90	9.45
3 种以上	17	1.79

3 讨 论

目前广泛应用于检测 HPV DNA 的方法有两种:一种是传统直接检测核酸 DNA(PCR)法,另一种是放大核酸信号法。膜杂交多重检测技术集中了 DNA 阵列、DNA 探针、核酸杂交、酶联显色四方面技术,是近几年发展创新的基因诊断技术,它分型更广,克服传统杂交时间长,杂交率低的不足,能快速、敏感、高特异性、多通道对 PCR 产物进行鉴定^[3]。本实验结果

显示,HPV 感染率 40.99%,与国外报道的 58.5%有一定差异,可能与种族、地域差异有关^[4]。HPV 亚型感染多集中在 21~50 岁年龄段,其阳性率占 91.6%。在大于 50 岁年龄段,未出现低危型感染,仅有 4.6%的高危型感染。不同年龄段 HPV 的感染情况同 Burk 等^[4]观点一致,HPV 感染阳性率在中青年性生活时达到一个高峰值后,随年龄的增长而明显下降。患者中存在 HPV 亚型多重感染现象,最多者达到 9 种感染,大多数多重感染中含有一种或两种以上高危型,从宫颈上皮细胞瘤样病变(CIN)发展到宫颈癌需 10~12 年,而 HPV 多重感染可能导致此癌变的时间缩短。HPV 亚型感染的高阳性率及年轻化趋势应引起临床的关注。高危型 HPV 与宫颈癌、外阴癌、肛门癌等恶性肿瘤相关,其中 HPV16 和 HPV18 是宫颈癌中最常见的型别,其次是 HPV52、56、58^[5]。本研究显示,HPV16 亚型阳性率为 21.85%,HPV18 亚型阳性率为 8.19%,HPV52 高达 24.26%,HPV58 为 15.14%,而 HPV56 仅有 2.20%,这与种族人群有一定关系。低危型中 HPV6、11 型极少出现在宫颈恶性组织中,主要引起外生殖器尖锐湿疣和宫颈良性病变,HPV16 是感染极高的型别,主要与宫颈鳞癌的发生有关,其次是 HPV18 与宫颈腺癌的发生有关^[6]。

HPV 基因分型诊断使流行病学的研究更深入化,定期、及时地进行 HPV 基因分型诊断是预防宫颈癌的有效途径。分子杂交技术证明在低危型 HPV 引起的尖锐湿疣中,病毒多以游离形式存在,而在高危型 HPV16 引起的宫颈癌中,绝大部分病毒 DNA 已整合入宿主细胞 DNA 中,而在 HPV DNA 中出现基因缺失或突变^[7-8]。膜杂交多重检测技术的应用实现了可同时进行 HPV 多种亚型检测,为临床诊断及科研提供更充分的数据,因此膜杂交多重检测技术在 HPV 基因分型诊断应用中具有重要意义。

参考文献

[1] 张菊,高艳娥,赵锦荣,等. HPV 检测在宫颈癌预警和筛查中的研究[J]. 国外医学·妇产科学分册,2003,30(5):319-322.

[2] 韩苏夏,邓怀慈. HPV 致宫颈癌分子机制研究[J]. 国外医学·妇幼保健分册,2003,14(1)20-22.

[3] 蔡虹. 深圳市城区育龄女性 HPV 感染状况调查[J]. 中国妇幼保健,2004,19(11):90-92.

[4] Burk RD, Kelly P, Feldman J, et al. Declining prevalence of cervi-co-vaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors[J]. Sex Transm Dis, 1996, 23(4):333-341.

[5] An HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of carcinoma and pre-cancerous lesions with human papliiomavirus (HPV) genotypes etected with the HPV DNA chip microarry method[J]. Cancer, 2003, 97(7):1672-1680.

[6] Altekruse SF, Lacey JV, Brinito LA, et al. Comparison of human papillomavirus genotypes, sexual, and reproductive risk factors of cervical adenocarcinoma and squamous cell carcinoma; Northeast-ern United States[J]. Am J Obstet Gynecol, 2003, 188(3):657-663.

[7] 车雅敏,王家壁. HPV 在宫颈癌发病中的作用机制研究[J]. 国外医学·肿瘤学分册,2004,4(31):306-309.

[8] 邹学东,曹薇,杨柳光. 膜杂交技术 HPV 基因分型联合液基细胞学在宫颈癌筛查中的应用[J]. 中国优生与遗传杂志,2009,4(25):86-87.