

- [4] 蒋最明,彭俊,顾敏,等. 1410 例儿童呼吸道感染病原体分析[J]. 中国感染控制杂志, 2013, 12(2): 129-131.
- [5] Kim CK, Choi J, Callaway Z, et al. Clinical and epidemiological comparison of human metapneumovirus and respiratory syncytial virus in Seoul, Korea, 2003-2008[J]. J Korean Med Sci, 2010, 25(3): 342-347.
- [6] 卢永芳,林卿,谢丹萍,等. 九项呼吸道病原体 IgM 抗体联合检测的临床意义[J]. 医学理论与实践, 2014, 27(18): 2383-2384, 2398.
- [7] 黄之文,何洲,黄进梅,等. 929 例患儿肺炎支原体感染与年龄的相关性研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(9): 1213-1214.
- [8] 勾朝阳,白峰岩. 南阳市呼吸道感染住院患儿非细菌病原体 IgM 抗体检测分析[J]. 中国实用医刊, 2015, 42(2): 68-69.
- [9] 李宁霞,王明磊,曹东辉. 9 项病原体 IgM 抗体在患儿呼吸道感染检测的应用研究[J]. 国际检验医学杂志, 2015, 36(14): 2059-2060, 2062.
- [10] Dumke R, Christian L, Jacobset E. Low rate of macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae strains in Germany between 2009 and 2012[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2013, 57(7): 3460.
- [11] Cao B, Zhao CJ, Yin YD, et al. High prevalence of macrolide resistance in Mycoplasma pneumoniae isolates from adult and adolescent patients with respiratory tract infection in China[J]. Clin Infect Dis, 2010, 51(2): 189-194.

(收稿日期:2017-01-02 修回日期:2017-02-28)

实时荧光定量 PCR 检测人乳头瘤病毒应用研究

陈丽,冯国钢

(广西壮族自治区百色市人民医院检验科 533000)

摘要:目的 探讨实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测人乳头瘤病毒(HPV)的应用价值。方法 随机选择 2015 年 2 月至 2016 年 2 月于本院就诊的宫颈病变患者 203 例,采用实时荧光定量 PCR 和第二代杂交捕获法(HC II)对宫颈组织标本进行 HPV DNA 检测,对检测结果进行分析。结果 77 例宫颈上皮内瘤变(CIN)患者实时荧光定量 PCR 和 HC II 法 HPV DNA 阳性检出率分别为 93.51%和 85.71%,二者比较差异无统计学意义($P>0.05$);和 72 例慢性宫颈炎及鳞状上皮病变患者实时荧光定量 PCR 和 HC II 法 HPV DNA 阳性检出率分别为 59.72%和 36.11%,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。203 例患者实时荧光定量 PCR 和 HC II 法 HPV DNA 阳性检出率分别为 71.43%和 57.64%,二者比较差异有统计学意义($P<0.05$)。结论 实时荧光定量 PCR 和 HC II 都可用于 HPV DNA 检测,二者对某些类型宫颈疾病的检测阳性率存在差异。实时荧光定量 PCR 检测对 HPV 感染具有一定的辅助诊断意义,有利于宫颈类疾病的早期诊治,值得推广应用。

关键词:实时荧光定量聚合酶链反应; 第二代杂交捕获法; 人乳头瘤病毒

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.037

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1539-02

人乳头瘤病毒(HPV)感染是导致宫颈癌及癌前病变的主要原因^[1-3]。多数宫颈上皮内瘤样病变(CIN)患者存在 HPV 感染,至少 85%的宫颈癌患者宫颈组织标本可检出 HPV DNA 片段,高危型 HPV DNA 检出率更高。因此,HPV DNA 检测有助于为宫颈癌诊断提供一定的依据,提高宫颈癌预防和治疗水平。HPV 种类较多,其中高危型主要包括 15 种,中国人群感染率较高的高危型 HPV 有 3 种^[4-6]。以往多采用第二代杂交捕获法(HC II)进行 HPV DNA 检测,灵敏度和特异度尚可。近年来,实时荧光聚合酶链反应(PCR)技术在 HPV DNA 检测中的应用日益广泛。本研究比较了实时荧光定量 PCR 和 HC II 两种方法 HPV DNA 检测结果。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 随机选择 2015 年 2 月至 2016 年 2 月于本院就诊的宫颈病变患者 203 例,年龄 24~65 岁,平均(35.5±6.3)岁,排除合并其他严重的生殖系统疾病患者。203 例患者中,包括 CIN 患者 77 例,其中 CIN I 级 40 例、CIN II 级 24 例、CIN III 级 13 例,慢性宫颈炎及鳞状上皮病变患者 72 例,其他类型病变患者 54 例。

1.2 方法 (1)实时荧光定量 PCR 检测:根据美国国立生物技术信息中心(NCBI)数据库中 HPV16 和 18 型 DNA 序列,合成 2 条约 80 bp 长的碱基片段,中间包括 15 个碱基互补重

叠区,采用片段重叠延伸法构建 HPV16 和 18 型阳性质粒。采用深圳凯杰生物工程有限公司 HPV 实时荧光定量 PCR 检测试剂盒及澳大利亚 Corbett-Research 公司 Rotor-geneQ 实时荧光定量 PCR 检测仪,对患者宫颈组织标本进行 HPV DNA 检测。特异性引物和探针分别与靶序列结合,Taq 酶在引物的引导下复制靶序列,遇到结合在 2 条引物之间的探针时,发挥 5'端外切酶功能,将探针水解,形成游离的羧基荧光素(FAM),FAM 荧光基团发射荧光,每合成 1 条 DNA 链,发射 1 次荧光信号。当靶序列呈指数增长时,发射的荧光信号量相应增长。因此,标本含有相应类型的 HPV DNA 时,可出现荧光信号的积累,从而达到检测 HPV DNA 的目的。(2)HC II 检测:采用常规 HC II 检测方法对患者宫颈组织标本进行 HPV DNA 检测。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 软件进行数据处理和统计学分析。计数资料以例数和百分率表示,组间比较采用卡方检验。不同方法检测结果一致性分析采用 Kappa 检验。 $P<0.05$ 为比较差异有统计学意义。

2 结果

2.1 HPV DNA 阳性检出率比较 CIN 患者实时荧光定量 PCR 法 HPV DNA 阳性检出率为 93.51%(72/77),HC II 法 HPV DNA 阳性检出率为 85.71%(66/77),二者比较差异无统计学意义的($P>0.05$);慢性宫颈炎及鳞状上皮病变患者实

时荧光定量 PCR 法 HPV DNA 阳性检出率为 59.72% (43/72), HC II 法 HPV DNA 阳性检出率为 36.11% (26/72), 二者

比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。两种方法 HPV DNA 阳性检出率见表 1。

表 1 两种方法 HPV DNA 阳性检出率 [n (%)]

| 检测方法 | CIN I 级 ($n=40$) | CIN II 级 ($n=24$) | CIN III 级 ($n=13$) | 慢性宫颈炎及鳞状上皮病变 ($n=72$) |
|------------|--------------------|---------------------|----------------------|-------------------------|
| HC II | 32(80.00) | 21(87.50) | 13(100.00) | 26(36.11) |
| 实时荧光定量 PCR | 35(87.50) | 24(100.00) | 13(100.00) | 43(59.72) |

2.2 HPV DNA 检测结果一致性分析 203 例患者实时荧光定量 PCR 法 HPV DNA 阳性检出率为 71.43% (145/203), HC II 法 HPV DNA 阳性检出率为 57.64% (117/203), 二者比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表 2。实时荧光定量 PCR 和 HC II 检测结果总符合率为 81.28% (165/203), $Kappa$ 值为 0.63 ($P < 0.05$)。

表 2 两种方法 HPV DNA 检测结果 (n)

| HC II | 实时荧光定量 PCR | | 合计 |
|-------|------------|----|-----|
| | 阳性 | 阴性 | |
| 阳性 | 117 | 10 | 127 |
| 阴性 | 28 | 48 | 76 |
| 合计 | 145 | 58 | 203 |

3 结 论

目前已知的 HPV 基因型大约有 100 多种, 其中至少有 40 种可导致生殖系统感染, 20 余种与恶性肿瘤的发生密切相关^[7-9]。根据致病能力的不同, 可将 HPV 分为高危型和低危型两种。低危型 HPV 感染易诱发湿疣。高危型感染 HPV 持续感染可导致病毒基因组和宿主细胞染色体脆性部位相互融合, 降低宿主细胞基因稳定性, 激活细胞癌基因, 进而诱发宫颈癌。有研究显示, 宫颈癌患者宫颈组织标本 HPV DNA 阳性检出率超过 85%^[10-12]。因此, HPV DNA 检测有助于宫颈疾病的预防和治疗。

以往多采用 HC II 法进行 HPV DNA 检测, 应用效果尚可。随着实验室诊断技术的发展, 实时荧光定量 PCR 检测在的临床应用越来越广泛^[13-15]。实时荧光定量 PCR 技术将荧光基因加入 PCR 反应体系, 在 PCR 反应过程中, 荧光染料特异性结合 DNA 双链, 在被水解、游离后, 发射荧光信号, 最终使荧光信号和 PCR 产物同步增加。采用全自动荧光定量扩增分析仪既有利于降低工作量, 简化工作程序, 也避免了人为因素对检测结果的影响, 保证了检测结果的准确性。不同分析方法对相同项目的检测结果存在一定的差异。本研究结果显示, 宫颈病变患者宫颈组织标本 HC II 和实时荧光定量 PCR 法 HPV DNA 检测结果总符合率为 81.28%, 说明两种检测方法对高危型 HPV DNA 的检测结果相关性较高。CIN 患者宫颈组织标本两种方法 HPV DNA 阳性检出率比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 但慢性宫颈炎及鳞状上皮病变患者实时荧光定量 PCR 法 HPV DNA 阳性检出率高于 HC II 法 ($P < 0.05$), 说明实时荧光定量 PCR 法在 HPV 感染诊断方面具有较高的应用价值。

综上所述, 实时荧光定量 PCR 和 HC II 都可用于 HPV DNA 检测, 检测结果相关性较好, 但对某些类型宫颈疾病的检测阳性率存在差异。实时荧光定量 PCR 检测对 HPV 感染具有一定的辅助诊断意义, 有利于宫颈类疾病的早期诊治, 值得推广应用。

参考文献

- [1] 肖克林, 严泽浩, 罗茗月, 等. 实时 PCR 和 PCR-RDB 法检测人乳头瘤病毒的比对研究[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(24): 3373-3374, 3376.
- [2] 陈海雁, 刘红军, 罗锦彬, 等. 多重实时 PCR 用于高危型人乳头瘤病毒感染检测的价值[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(11): 1395-1396.
- [3] 王淑琴, 张丽颖, 刘丽娜, 等. 人乳头瘤病毒感染与人乳头瘤病毒疫苗的研究进展[J]. 国际免疫学杂志, 2015, 38(3): 293-296.
- [4] 陈园园, 王英红. 人乳头瘤病毒亚型检测的意义和应用研究[J]. 医学综述, 2015, 21(6): 1006-1008.
- [5] 李惠贞. 实时 PCR 检验在高危型人乳头瘤病毒中的诊断价值分析[J]. 中外医学研究, 2015, 5(5): 62-63.
- [6] 韩小娟, 张轩. 多重实时 PCR 技术对高危型人乳头瘤病毒感染检测的临床意义[J]. 医药论坛杂志, 2014, 12(23): 169-170.
- [7] Snellenberg S, Schutze DM, Claassen-Kramer D, et al. Methylation status of the E2 binding sites of HPV16 in cervical lesions determined with the Luminex(R) xMAP(TM) system[J]. Virology, 2012, 422(2): 357-365.
- [8] Clarke MA, Wentzensen N, Mirabello L, et al. Human papillomavirus DNA methylation as a potential biomarker for cervical cancer[J]. Cancer Epidemiol Biomark Prevent, 2012, 21(12): 2125-2137.
- [9] 王琳, 梁红芬. 实时荧光 PCR 在高危型人乳头瘤病毒检验中的诊断价值分析[J]. 牡丹江医学院学报, 2015, 3(3): 91-93.
- [10] 陈静娜, 陈丽丹, 张卫云, 等. 女性高危型人乳头瘤病毒感染 2501 例调查[J]. 南方医科大学学报, 2015, 35(10): 1487-1491.
- [11] 赵一琳, 崔映红, 黄少芝. PCR-荧光法与 PCR-膜杂交法在检测 HPV-DNA 中的比较分析[J]. 国际检验医学杂志, 2016, 2(2): 204-206.
- [12] 邓波, 邱振华, 叶小媚. 实时 PCR 检验在高危型人乳头瘤病毒中的诊断价值分析[J]. 临床医学工程, 2016, 3(5): 343-344.
- [13] 蓝巨辉, 赵劲松. 实时荧光定量 PCR 法与杂交捕获法在高危型 HPV 检测中的比较[J]. 标记免疫分析与临床, 2013, 2(7): 124-125.
- [14] 张海平, 穆会君, 谢平, 等. 多重实时荧光 PCR 技术检测高危型人乳头瘤病毒的临床应用分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(17): 2256-2258.
- [15] 胥文. 实时荧光 PCR 在人乳头瘤病毒临床检测中的应用[J]. 中国当代医药, 2013, 20(7): 76-77, 79.