

多重主要为二重感染,以高危型和混合型多见^[3]。随着年龄的增长高危 HPV 的感染持续增加,到达一定年龄后又开始下降^[4]。对健康体检的人群及存在宫颈病变的人群进行 HPV 感染的筛查可以选择不同的方式,在发达国家 HPV DNA 检测已经被列入宫颈癌筛查必做项目^[5-6],结合国内实际对于健康人群可以进行 HPV-HR DNA 的检测,筛查出阳性者再做分型检测,明确基因型,采取不同的治疗措施,进而获得满意的治疗效果。对于存在临床症状的人群直接进行 HPV 基因分型更有现实的意义。

宫颈癌患者从感染 HPV 到宫颈癌的潜伏期时间很长。所以实现 HPV 早期筛查对筛查宫颈癌有重要意义,对早期进行诊断、规范治疗以及预测病变进展等具有重要价值。充分掌握 HPV 感染的情况及亚型分布,对发现 HPV 感染的高危人群,进行 HPV 感染的控制和有效治疗有重要意义,进而对降低宫颈癌的发生率产生积极的影响^[7-8]。

参考文献

[1] 温旺荣,李莉. HPV 基因检测技术新进展[J]. 中华检验医学杂志,2015,38(8):514-516.

[2] WEN W R, LI L. Progresses in HPV gene detection technology[J]. Chin J Lab Med, 2015, 39(8): 514-516.

[3] 任玲,石启明. 徐州地区 39 997 例女性生殖道人乳头瘤病毒检测结果分析[J]. 现代预防医学, 2015, 42(11): 1996-1998.

[4] REN L, SHI Q M. Analysis of detection of human papilloma virus in 39997 cases in Xuzhou[J]. Modern Preventive Medicine, 2002, 32(11): 1996-1998.

[5] 杨二姣,潘琪,江虹,等. 两种高危型 HPV 检测技术诊断宫颈病变的临床价值比较[J]. 现代生物医学进展, 2015, 15(4): 653-655.

[3] YANG E J, PAN Q, JANG H, et al. Comparison of the Clinical Significances of two Kinds of High-risk Type HPV Detection Technology in the Diagnosis of Cervical Lesions, [J]. Progress in Modern Biomedicine. 2015, 45(4): 653-655.

[7] 刘永良. 导流杂交基因芯片检测 HPV-DNA 亚型 1 760 例结果分析[J]. 诊断病理学杂志, 2015, 22(1): 59.

[8] LIU Y L. Analysis results of 1 760 cases for microarray Diversion hybridization detect HPV DNA subtype [J]. Chinese J Diag Path, 2015, 34(1): 62.

(收稿日期:2017-09-28 修回日期:2017-12-14)

• 短篇论著 •

PCR 反向点杂交技术与 DNA 测序法检测 HPV 的对比研究*

许爱敏,张丽萍,周惠芳

(喀什地区第一人民医院,新疆喀什 844000)

摘要:目的 通过 PCR 反向点杂交技术检测人乳头瘤病毒(HPV),并采用 DNA 测序法对此方法进行验证,比较两种检测方法的一致性,为临床使用 PCR 反向点杂交技术进行 HPV DNA 检测提供准确依据。方法 采用 PCR 反向点杂交技术和 DNA 测序法对喀什地区第一人民医院妇科门诊收集的 27 例 HPV 感染患者进行检测,将两种检测方法得到的检测结果进行比对。结果 采用 PCR 反向点杂交技术和 DNA 测序法得到的检测结果一致,27 例样本中阳性检出率 100.0%,其中高危型检出率为 85.2%,低危型检出率为 14.8%,多重型别感染率为 25.9%。结论 两种 HPV 检测方法的结果符合率 100.0%,PCR-反向点杂交技术检测结果准确度高,可以为临床诊断提供准确可靠的依据。

关键词:PCR 反向点杂交法; DNA 测序; HPV

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2018.08.028

文章编号:1673-4130(2018)08-0991-03

中图法分类号:R446.5

文献标识码:B

近年来,随着宫颈癌发病率不断上升并呈年轻化趋势,国内对人乳头瘤病毒(HPV)的研究也不断深入。大量的流行病学资料表明,高危型 HPV 感染是宫颈癌及其癌前病变发病的必要条件^[1]。基于有力的临床研究数据,美国阴道镜和宫颈病理学会(ASCCP)和美国妇科肿瘤学会(SGO)在 2015 年发表了宫

颈癌筛查中期指南,推荐 HPV 检测作为宫颈癌筛查的重要手段^[2-3]。HPV DNA 检测是直接针对病原体的检查,从感染到癌变的全过程均可检出,更具时间提示性,能够将已经患宫颈癌或癌前病变的妇女以及存在潜在发病风险的妇女筛选出来^[4]。因而加强防治和监控 HPV 的感染状态已成为预防和诊治宫颈癌

* 基金项目:喀什地区自然科学基金项目(KS2015012)。

本文引用格式:许爱敏,张丽萍,周惠芳. PCR 反向点杂交技术与 DNA 测序法检测 HPV 的对比研究[J]. 国际检验医学杂志,2018,39(8):

及癌前病变的主要手段。本文拟采用 DNA 测序的方法对 PCR 反向点杂交技术的检测方法进行验证, 比较两种检测方法结果的一致性, 为临床的应用提供准确依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集喀什地区第一人民医院妇科门诊就诊的 27 例 HPV 感染患者病历资料为研究对象, 其中维吾尔族 15 例, 汉族 12 例。患者年龄为 33~69 岁, 平均年龄(46.81±8.93)岁。

1.2 方法

1.2.1 PCR 反向点杂交法检测 HPV 收集 27 例患者的新鲜宫颈脱落细胞, 以专用宫颈细胞采集器(宫颈刷)进行采样。采集的标本室温保存不超过 12 h, 冰箱 4℃ 保存不超过 24 h, -18℃ 保存不超过 3 个月, 避免标本反复冻融。使用亚能生物技术(深圳)有限公司生产的 HPV 基因分型检测试剂盒进行分型检测。即设计特异性引物, 对病毒 DNA 片段进行 PCR 扩增, 得到大量带有标记的 PCR 产物, 并利用膜芯片上特异的分型探针与病毒 DNA 片段进行特异性杂交, 从而对病毒 DNA 进行型别检测, 最后通过化学显色, 根据显色信号判读结果。

1.2.2 DNA 测序法检测 HPV 27 例标本的 PCR 扩增产物纯化后送至亚能生物技术(深圳)有限公司进行 HPV DNA 测序, 根据型别设计不同的引物, 并将 DNA 测序结果与 NCBI 中对应 HPV 型别参照序列进行比对, 将测序结果作为 HPV 感染标准。

1.3 方法学评价 27 例 HPV 感染患者同时采用 PCR 反向点杂交法和 DNA 测序法进行检测。以 DNA 测序法检测结果为“金标准”, 比较两种检测方法的阳性率及符合率。

2 结果

采用 PCR 反向点杂交法和 DNA 测序法得到的检测结果一致, 符合率 100.0%。27 例样本的阳性检出率 100.0%, 其中高危型检出率为 85.2%, 低危型检出率为型别 14.8%, 多重型别感染率为 25.9%。共检出 16 个 HPV 基因型, 总检出频次 37 次; 其中 HPV 42、52、53、58 型检出次数较多, 占总检出的 46.94%, 其中的为 58 型, 检出 7 次, 占 14.29%, 其余各型检出率平均为 4.82%, 见表 1。

表 1 特异引物扩增联合一代测序结果及 Genebank 序列号

样本编号	特异引物扩增联合一代测序结果	Genebank 序列号
1	HPV58 型	KU550607.1
7	HPV52 型	KY077863.1
9	HPV56 型	KU050121.1
18	HPV81 型	GQ288792.1

续表 1 特异引物扩增联合一代测序结果及 Genebank 序列号

样本编号	特异引物扩增联合一代测序结果	Genebank 序列号
23	HPV39 型	KC470245.1
32	HPV53 型	KU951266.1
34	HPV51 型	KU050116.1
36	HPV16 型	KU951179.1
39	HPV66 型	KT375740.1
43	HPV6、42、56 型	6 型基因序列: KU050108.1 42 型基因序列: JQ902377.1 56 型基因序列: KU050122.1
46	HPV59 型	KC470262.1
50	HPV68 型	KT070120.1
52	HPV35 型	KU050113.1
53	HPV42 型	JQ902118.1
61	HPV53、58 型	53 型基因序列: KU951259.1 58 型基因序列: KU050158.1
78	HPV16、51、56 型	16 型基因序列: KU951195.1 51 型基因序列: KT725857.1 56 型基因序列: KU298918.1
91	HPV18 型	KT365832.1
98	HPV43、56 型	43 型基因序列: HE962408.1 56 型基因序列: KT070132.1
100	HPV51、59 型	51 型基因序列: KU050116.1 59 型基因序列: EU911391.1
134	HPV 6、51 型	6 型基因序列: KU050106.1 51 型基因序列: KU050116.1
136	HPV43、52、81 型	43 型基因序列: AJ620205.1 52 型基因序列: KY077863.1 81 型基因序列: AJ620209.1

注: 重复样本结果只列出一个, 具体基因序列可参考 Genebank

3 讨论

宫颈癌是目前临床上最为常见的妇科恶性肿瘤之一, 已知的 HPV 型别目前已有 100 余种, 其中 40 多种与生殖道疾病有关, 不同地区感染 HPV 的型别有较大差异^[5-6]。新疆由于地处偏远、自然环境恶劣、多民族聚居、经济条件落后等不利因素的影响, 宫颈癌的发病率和致死率逐年增加。郑义等^[7]的研究分析表明, 新疆 HPV 感染型别有差异, 国内 HPV 感染型以 16、33、58、18 为主, 而新疆则以 16、59、56、33 等型为主。现有 HPV 检测技术主要包括杂交捕获法、酶切信号放大法、PCR 荧光探针法以及 PCR 反向点杂交法等^[8], 针对新疆地区的特殊 HPV 感染状况, 选择一种型别覆盖广、准确性高、特异型好、操作简便、适用于临床的技术方法尤为重要。

PCR 反向点杂交法和 DNA 测序法的 HPV 检出率一致。PCR 反向点杂交法用于 HPV 基因分型检测是一种准确性高, 特异度好, 适用于临床的技术方法。本研究使用的 PCR 反向点杂交检测是利用 HPV 的基因特点设计特异性的带有生物素标记的引物及独有的 HPV 基因型探针, 扩增出 23 种 HPV 基因型的目的片段, 再将扩增产物与固定在膜条上的包括 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这些 HPV 基因型的感染^[8]。仅一次检测即可完成 23 种 HPV 精准分型的检测, 克服了其他 HPV 检测方法无法分型或样本通量小、覆盖型别少的缺点。另有研究指出, 高危型 HPV 感染(HPV16 或 18 型)从诱发直至形成宫颈浸润癌, 其过程持续时间在 10 年不等^[9-10]。可见 HPV 基因分型检测对确定不同型 HPV 感染的自然历程以及高危型 HPV 持续感染在子宫颈癌发展过程中的作用有十分重要的意义^[11-12]。

研究中的特异引物扩增联合一代测序检测是根据已发表的 HPV 基因组序列, 设计能够扩增出 HPV L1 区的特异引物, 再使用深圳亚能医学检验所一代测序仪对扩增产物进行序列测定, 然后将测出的序列与 NCBI 网站序列比对, 根据比对结果判断是否有 HPV 基因型的感染。PCR 反向点杂交技术则是采用尼龙膜芯片, 设计特异性的带有生物素标记的引物进行 PCR 扩增^[13-14], 将产物变性后与独有的 HPV 基因型探针, 根据碱基互补配对原则进行杂交, 检测是否感染 HPV 病毒, 以及对感染的 HPV 病毒进行精准分型。有研究显示, HPV 多重感染是造成子宫颈上皮细胞癌的主要因素之一^[15]。本实验的单一 HPV 感染与多重 HPV 感染的检测结果与 DNA 测序结果完全一致, 可证明 23 种型别之间不会有交叉杂交反应, 具有很高的特异性。

本研究将 HPV DNA 测序结果作为判断 HPV 感染的标准。PCR 反向点杂交技术与 DNA 测序法的检测结果完全一致, 验证了该检测方法结合了 PCR 技术和基因芯片技术, 利用 PCR 技术的高灵敏度、基因芯片的高通量性, 灵敏度高, 特异度强, 检测结果可靠准确, 快速诊断 HPV 的感染, 可以为临床 HPV 感染的诊断及宫颈癌流行病学研究提供准确依据, 对于药物疗效的观察及宫颈癌的早期预防具有重要意义。

参考文献

[1] ALAMEDA F, GARROTE L, MOJAL S, et al. Cervista HPV HR test for cervical cancer screening: a comparative study in the Catalan population[J]. Arch Pathol Lab

Med, 2015, 139(8):241-244.

- [2] KITCHENER H C, ALMONTE M, THOMSON C, et al. HPV testing in combination with liquid-based cytology in primary cervical screening (ARTISTIC): a randomised controlled trial[J]. Lancet Oncol, 2009, 10(9):672-682.
- [3] MOLIJN A, KLETER B, QUINT W, et al. Molecular diagnosis of human papillomavirus (HPV) infections[J]. J Clin Virol, 2005, 32(1):43-51.
- [4] 唐霄, 杨帆, 何英, 等. 人乳头瘤病毒基因亚型分布及与宫颈病变关系分析[J]. 实用妇产科杂志, 2013, 29(7):302-305.
- [5] LIU S S, CHAN K Y, LEUNG R C, et al. Prevalence and risk factors of Human Papillomavirus (HPV) infection in southern Chinese women—a population-based study [J]. PLoS One, 2011, 6(5):e19244.
- [6] 徐华林, 卞美璐, 陈庆云, 等. 多聚酶链反应方法与杂交捕获 1 代在人乳头瘤病毒感染检测及宫颈病变诊断中的应用价值[J]. 中国实用妇科与产科杂志, 2010, 26(6):455-458.
- [7] 郑义, 井明霞, 张金丽, 等. 新疆维族妇女感染的 HPV 型别分布的研究[J]. 现代生物医学进展, 2012, 12(1):1285-1287.
- [8] 黄庆, 府伟灵, 周玉, 等. 基因芯片对人乳头瘤病毒的快速检测和分型[J]. 中华医院感染学杂志, 2005, 15(4):476-478.
- [9] 佟锐, 王纯雁. HPV-DNA、TCT 联合检测在宫颈癌中的诊断价值[J]. 中国实验诊断学, 2014, 18(4):580-581.
- [10] 温寿青, 邱立, 钟美莲, 等. TCT 制片质量控制和宫颈癌诊断[J]. 现代肿瘤医学, 2009, 17(8):1430-1431.
- [11] ZHAO R, ZHANG W Y, WU M H, et al. Human papillomavirus infection in Beijing people's republic of China: a population-based study[J]. Br J Cancer, 2009, 101(9):1635-1640.
- [12] LEE H, LEE K J, JUNG C K, et al. Expression of HPV L1 capsid protein in cervical specimens with HPV infection[J]. Diagn Cytopathol, 2008, 36(11):864-867.
- [13] GREER B E, KOH W J, ABU-RUSTUM N R, et al. Cervical cancer[J]. J Natl Compr Canc Netw, 2010, 8(12):1388-1416.
- [14] FERNANDES J V, MEISSNER R V, CARVALHO M G, et al. Prevalence of human papillomavirus in archival samples obtained from patients with cervical pre-malignant and malignant lesions from Northeast Brazil [J]. BMC Res Notes, 2010, 67(1):96-98.
- [15] 陶萍萍, 李敏. HPV 多重感染与宫颈病变关系探讨[J]. 妇产科临床杂志, 2006, 7(2):94-96.