

- [2] 陈东科,孙长贵.实用临床微生物学检验与图谱[M].北京:人民卫生出版社,2011:554-555.
- [3] 周庭银.临床微生物学诊断与图解[M].2版.上海:上海科学技术出版社,2007:289-293.
- [4] 刘长德,张艳,于成源,等.支原体培养假阳性结果原因分析[J].中华检验医学杂志,2006,29(3):214-216.
- [5] 叶应妩,王毓三,申子瑜.全国I临床检验操作规程[M].3版.南京:东南大学出版社,2006:725-726.
- [6] 周芸,许学岚,王春平,等.327例输卵管性不孕患者生殖道衣原体、支原体检测及药物敏感分析[J].中华实验和临床病毒学杂志,2011,25(3):201-204.
- [7] 马春杰,唐立新,蒋敏,等.供精者解脲支原体感染与精液参数的相关性研究[J].广东医学,2006,27(1):59-61.
- [8] 邓忠莉.梅州地区不孕不育症 355 例临床分析[J].南方医科大学学报,2006,26(5):714-716.
- [9] 张丽梅,徐韞健,廖伟娇,等.泌尿生殖道支原体耐药性分析及其合并细菌、念珠菌感染情况[J].广州医药,2009,40(1):28-31.
- [10] 吕宁,陈建波,肖颜玉,等.5724 例泌尿生殖道感染的支原体感染状况及药物敏感结果分析[J].重庆医学,2013,42(22):2649-2651.
- [11] 钟培丽,宋慧娟,李练红.复发性外阴阴道真菌感染合并支原体感染的研究[J].临床和实验医学杂志,2010,9(17):1877-1880.
- [12] 汪丽,吕婉飞,张媛媛,等.2007~2008 年医院常见病原菌的耐药性监测[J].中华医院感染学杂志,2009,19(23):3244-3246.

(收稿日期:2014-02-15)

• 经验交流 •

导流杂交基因芯片技术检测人乳头状瘤病毒基因分型的结果分析

黄德秋,廖燕飞,陈 燕,钟雪兵
(肇庆市中医院检验科,广东肇庆 526020)

摘 要:目的 了解本地区女性人乳头状瘤病毒(HPV)感染年龄及基因亚型的分布特点。方法 采用快速导流杂交基因芯片技术(Hybrimax),对 530 例门诊及住院患者宫颈口及宫颈脱落上皮细胞进行 21 种 HPV 感染基因亚型的检测。结果 HPV 总感染率为 30.9%,其中高危型感染率为 72.5%,低危型感染率为 27.5%;在年龄分布中,<30 岁组感染率较高,占检测数的 48%,高危型占 36%;在 164 例阳性者中,一重感染率为 71.9%,二重及以上感染率为 28.1%($P<0.05$);在 21 种分型中高危型以 52(14.1%)、58(11.2%)、16(10.6%)、18(8.2%)和 39(8.2%)为主,低危型以 6(14.1%)为主。结论 快速导流杂交法 HPV 基因分型检测,为女性宫颈疾病流行病学及防治提供重要的线索,了解 HPV 感染及本地区 HPV 亚型的分布情况,对本地区常见、多见的亚型提供疫苗防治的理论基础,为有效防治宫颈上皮内瘤样病变,降低宫颈癌的发病率,具有积极意义。

关键词:人乳头状瘤病毒; 导流杂交基因芯片技术; 基因分型

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.059

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)13-1795-03

自从上世纪 70 年代首次发现人乳头状瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发生的一个重要的原因以来,宫颈癌与 HPV 感染的相关研究不断深入;现已明确 HPV 的持续感染是宫颈癌发生的必要条件,从宫颈上皮不典型增生到浸润癌是一个持续发生、发展的过程,大约需要 10 年时间。并且 HPV 属于乳多空病毒科的乳头状瘤空泡病毒 A 属,它是一个无包膜小型双链环状 DNA 病毒,呈二十面体对称球形,直径 45~55 nm,具有强烈嗜上皮性、高度组织和宿主特异性,DNA 序列分析发现 HPV 至少有 200 多个基因型,迄今已确定基因组全序列的 HPV 基因型有 85 种,其中 42 种与人类疾病有关^[1],根据不同型号,依次分为低危型和高危型,低危型主要引起尖锐湿疣等疣症,高危型是诱发宫颈癌的重要致病因素。因此,对 HPV 进行准确的基因分型,明确患者感染 HPV 的高低危型别,对 HPV 感染的治疗、宫颈癌的预防、流行状况的调查及基因疫苗的研制均有重要的临床意义^[2]。

作者采用快速导流杂交基因芯片法,对门诊及住院患者 HPV 21 种基因分型进行检测及分析,现将结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2013 年 3 月至 2013 年 12 月期间在本院妇科住院及门诊就诊,怀疑 HPV 感染的女性共计 530 例,年龄 16~60 岁,平均(36.5±5.2)岁。

1.2 仪器与试剂 DA-7600 型核酸扩增检测仪,HybriMax-

MHH2 型核酸分子快速杂交仪,阿尔泰 BHC-1100 II A2 超净工作台,干热器、离心管、扩增管、离心机、移液器、旋涡振荡器等。HPV 基因分型检测杂交试剂盒(由广东潮州凯普生物化学有限公司提供)。

1.3 样本处理 在妇科医师指导下采用扩阴器暴露宫颈口,将宫颈口的分泌物擦去,然后用凯普公司配套专用宫颈刷伸入宫颈口处,轻轻搓动宫颈刷使其顺时针转 3 至 5 圈,慢慢抽出宫颈刷,将其放入装有细胞保存液的样本管中;在管口处将多余的刷柄折断,将刷头留在样本管中,立即送检或置冰箱(4℃)中保存,并在 2 周内检测。

1.4 方法

1.4.1 原理 快速导流低密度基因芯片杂交技术是将其基因扩增(PCR)技术、导流杂交技术与基因芯片技术集合在一起,结合了 PCR 技术的高灵敏、导流杂交技术的高特异性以及基因芯片的高通量性;该技术可将未标记的特异性核苷酸探针分别固定在尼龙膜上形成斑点,再与经 PCR 扩增的标记样品 DNA 序列杂交,可一次性检测 21 种 HPV 病毒感染并精确分型^[3],这些型别包含 15 种高危型(16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66 和 68)及 6 种低危型(6、11、42、43、44 和 81)。

1.4.2 DNA 的提取 取 500 μL 临床样本,14 000 r/min 离心 1 min,去上清液。加入 400 μL 溶液 I,混匀后沸水中煮 15

min, 稍微冷却后, 加入 400 μ L 溶液 II, 混匀, 室温下放置 2 min, 14 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 室温放置 2 min, 加入 60 μ L 溶液 III 充分溶解, 备做 PCR 检测。

1.4.3 PCR 扩增 将 PCR 反应试剂 Mix、DNA Taq 酶按比例混合后在扩增管中加入 24 μ L, 再加入 1 μ L DNA 模板混匀, 按照设定的温度和时间进行扩增 40 个循环; 同时扩增设阴、阳性对照各一份。

1.4.4 导流杂交 打开核酸分子快速杂交仪, 放入与实验样品数相同的、标记有 21 种 HPV 基因型寡核苷酸探针的基因芯片杂交膜, 严格按试剂盒说明书进行导流杂交, 加酶标显色。

1.4.5 结果判断 检测结果阳性点为肉眼可见的清晰蓝紫色圆点, 根据膜条 HPV 分型分布图(如图 1)判断阳性点为何种 HPV 病毒感染类型, 同时每张芯片上有反应质控点和杂交显色质控点各一个。

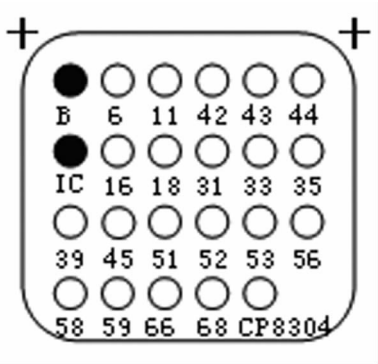


图 1 HPV 分型分布图

1.5 统计学处理 采用 SPSS 11.5 统计软件进行统计学分析, 感染率用 χ^2 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 感染率及型别分布 HPV 感染的型别主要以高危型 52(14.1%)、58(11.2%)、16(10.6%)、18(8.2%) 和 39(8.2%) 为主, 低危型以 6(14.1%) 型为主, 见图 2。

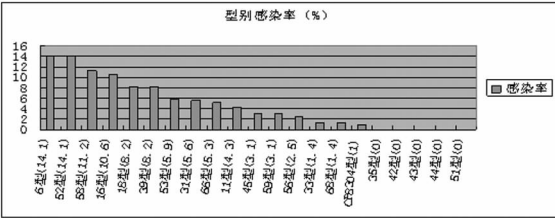


图 2 感染型别分布图

2.2 HPV 感染与年龄分布 HPV 感染主要以小于 30 岁年轻女性为主(占 48%), 其中高危型占 36%, 见表 1。

表 1 HPV 感染与年龄分布表[n(%)]

年龄(岁)	检测人次	HPV 阳性	高危型	低危型
<30	175	84(48.0)	59(36.0)	25(15.3)
30~40	139	40(28.7)	31(18.9)	9(5.5)
>40~50	121	21(17.3)	15(9.1)	6(3.7)
>50	95	19(20.0)	14(8.5)	5(3.0)
合计	530	164(30.9)	119(72.5)	45(27.5)

2.3 HPV 多重感染阳性率分布 HPV 感染以一重感染为主(占 71.9%), 二重感染为 16.5%, 见表 2。

表 3 HPV 多重感染分布表

类型	n	分布率(%)
一重感染	118	71.9
二重感染	27	16.5
三重感染	9	5.5
四重感染	4	2.4
五重及以上感染	6	3.7

3 讨 论

HPV 是一类具有严格宿主范围和组织特异性的病毒, 性接触是其传播的主要途经, HPV 感染多为短暂性感染, 大多数在 2 年内消失, 自然清除时间约为 7~12 个月; 高危型持续感染是诱发宫颈癌的主要病因, 若不及时治疗或干预, 约 30% 患者可发展为宫颈上皮内瘤样病变(CIN), CIN 作为癌前病变, 有 20% 可发展为宫颈癌^[4]。因此, HPV 感染是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的主要致病因素。宫颈癌也成为人类历史上少有几个找到明确病因的肿瘤之一^[5], 而且几乎所有宫颈癌患者样本中均能找到高危型 HPV 病毒^[6]。因此, 作者采用快速导流基因芯片杂交技术对 15 种高危型和 6 种低危型 HPV 进行检测并具体分型, 在检测中发现, HPV 的感染率为 31.1%, 其中高危型以 52(14.1%)、58(11.2%)、16(10.6%)、18(8.2%) 和 39(8.2%) 型为主, 该 5 种亚型检出例数占总亚型检出例数的 52.3%; 低危型以 6(14.1%) 型为主。此结果与国内相关报道相接近, 但亦有差异, 如赵健等^[7]对北京地区报道的亚型有 16(15.9%)、58(11.2%)、52(8.5%)、33(6.3%) 和 53(6.2%); 彭永排等^[8]对广州地区的报道以 52(21.9%)、31(14.0%)、16(11.0%)、58(11.0%) 和 53(9.7%) 为主。说明 HPV 感染亚型在不同地区人群的感染率不同, 所携带的型别也不同, 亚型分布存在一定的地域差异性。因此, 应加强各地区妇女 HPV 的检测, 以了解型别分布。在高危型感染中, 宫颈癌的感染率国外以 HPV-16、18 型为主^[9]。而在本院住院已确诊的 5 例宫颈癌病例中都是 16 型, 与报道相一致。

在年龄分布方面, HPV 感染以性活跃的年轻女性为最常见, 在小于 30 岁的年龄段 HPV 感染率最高, 达到 48%, 在高、低危型分组感染率中高危型占 36%; 而在大于 50 岁的年龄段感染率有 20%, 在高、低危型分组感染率中高危型占 8.5%。由此可见, HPV 感染率有随着年龄增加而递减的趋势, 说明越年轻感染率越高^[1]。

HPV 具有混合各种亚型感染的特点, 在分析感染率中得出, HPV 感染以单一为主, 其中一重感染率为 71.9%, 二重及以上感染率为 28.1%, 与一重感染率相比差异有统计学意义($P<0.05$), 在混合感染中以二重多见, 但在作者检测中发现 1 例八重感染的患者; 有学者认为 HPV 多重感染不增加宫颈癌的发生^[10], 但也有学者认为 HPV 多重感染出现持续感染危险性更大, 是宫颈病变发生的重要原因, 多重感染易至宫颈发生 CIN 甚至 SCC^[11]。

综上所述, HPV 基因分型检测可为妇女宫颈疾病流行病

学及防治提供重要的线索。所以加强妇女 HPV 的检查,了解 HPV 感染及本地区 HPV 亚型的分布情况,对于发现 HPV 感染的高危人群,要积极随访、有效控制、及早治疗。对本地区常见、多见的亚型提供疫苗防治的理论基础,为有效防治宫颈上皮内瘤样病变和降低宫颈癌的发病率,具有积极的意义。

参考文献

[1] 刘聪,宋小婕,胡婷,等.鄂中地区 8136 例妇女 HPV 感染流杂交法亚型检测的临床意义[J].医学分子生物学杂志,2010,7(5):425-429.

[2] 王晓静,刘玉玲. HPV 分型检测在宫颈癌前病变筛查中的应用价值[J].医学论坛杂志,2008,29(1):29-30.

[3] 汪欣,赵素萍,魏建威.福州地区 935 例妇女 HPV 感染情况的分析[J].分子诊断与治疗杂志,2011,3(1):90-92.

[4] 刘筑玉,李建梅,范燕红,等.432 例 HPV 检测结果和宫颈病变的关系分析[J].中国妇幼保健,2009,24(14):1919-1920.

[5] 李毅坚,王成,袁健生,等.佛山市南海区妇女子宫颈乳头状瘤病毒感染现状及相关因素分析[J].现代医院,2011,11(1):97-99.

[6] Peltiecu G, Bari M, Lancu G, et al. Human papilloma virus and cer-

vical preinvasive disease[J]. J Med Life, 2009, 2(2):373-377.

[7] 赵健,杨英捷,廖秦平. 导流杂交基因芯片技术在人乳头状瘤病毒分型检测中的临床应用[J]. 中华检验医学杂志, 2006, 29(12): 1148-1151.

[8] 彭永排,林仲秋,陆晓楣,等. 广州市 1285 例志愿者宫颈乳头瘤病毒感染调查[J]. 国际医药卫生导报, 2010, 16(1):101-104.

[9] Sastellsague X, Klaustermeier J, Carrilho C, et al. Vaccine-re-lated HPV genotypes in women with and without cervical cancer in Mozambique: burden and potential for prevention[J]. Int J Cancer, 2008, 122(8):1901-1904.

[10] An HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method[J]. Cancer, 2003, 97(15):1672-1680.

[11] Ho GY, Bierman R, Beardsley L, et al. Natural history of cervico-vaginal papillomavirus infection in young women[J]. N Engl J Med, 1998, 338(3):423-428.

(收稿日期:2014-01-28)

• 经验交流 •

检测胃食管反流病患者治疗期维生素 B₁₂ 和血清铁的水平及意义

杨 燕¹, 徐金莲¹, 蒋 锐²

(湖北省荆门市第一人民医院:1. 检验科;2. 血液科,湖北荆门 448100)

摘 要:目的 检测胃食管反流病(GERD)患者治疗期间维生素 B₁₂ 和血清铁水平,探讨其在抗胃酸治疗中的意义。方法 对本院 2011~2013 年收治的 45 例 GERD 患者和 57 例健康体检者进行研究,分别在治疗前,治疗 6 个月、12 个月、18 个月及 24 个月后采血用全自动生化分析仪检测两组中维生素 B₁₂ 和血清铁水平,然后进行统计学分析。结果 GERD 患者治疗 24 个月后维生素 B₁₂ 为 (300.91±74.17)pg/mL, 比对照组 [(397.13±28.38)pg/mL] 低 ($P<0.05$); 血清铁水平与对照组比较差异无统计学意义 ($P>0.05$)。结论 GERD 患者在长期抗胃酸治疗时应注意维生素 B₁₂ 水平和血清铁检测,以避免在病程中增加贫血的风险。

关键词:胃食管反流病; 质子泵抑制剂; 维生素 B₁₂; 血清铁; 贫血

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.13.060

文献标识码:B

文章编号:1673-4130(2014)13-1797-03

胃食管反流病(gastroesophageal reflux disease, GERD)发病率高,常见症状群是指胃内容物反流入食管引起的烧心、反酸为典型症状,还可出现其他相关症状,如:慢性咳嗽、咽喉炎、哮喘、气管炎、胸疼等^[1]。在 GERD 患者治疗上会使用抗胃酸药物来改善症状,最常见的就是质子泵抑制剂或组胺-2 受体拮抗剂。近期有研究发现,长期使用抗胃酸药物会引起成人贫血的发生,其中以血红蛋白的减少和血细胞比容的下降为主^[2],其贫血原因尚未形成定论,国内更是缺少长期相关报道。本研究检测长期使用抗胃酸药物的 GERD 患者中维生素 B₁₂ 和血清铁的水平,并探讨他们之间的相关性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2011~2013 年收治的 45 例 GERD 患者作为研究对象,为 GERD 患者组,入选条件的病例均符合临床症状、内镜和病理组织标准,同时排除相关慢性疾病如贫血、糖尿病、病毒性肝炎、甲状腺功能异常、癌症和服用维生素 B₁₂ 和铁剂或其他复合维生素的患者。45 例 GERD 患者组中,男 29 例,女 16 例,平均年龄 48.2 岁(24~68 岁)。同期选取 57 例健

康体检者为对照组,均为湖北省荆门市第一人民医院体检健康者,其中男 33 例,女 24 例,平均年龄 45.8 岁(27~65 岁)。

1.2 GERD 患者一般情况分级 根据 1999 年洛杉矶反流性食管炎内镜下诊断分类标准,GERD 患者组 A 级 4 例, B 级 9 例, C 级 20 例, D 级 12 例。排除严重心肺功能不全的患者,并在实验前及实验过程中未接受过胃及回肠切除术,且胰腺功能正常的患者。

1.3 仪器与试剂 维生素 B₁₂ 和血清铁的检测均使用北京海科瑞生物技术公司生产的试剂盒,并在贝克曼-奥林巴斯 AU2700 全自动生化分析仪上检测。

1.4 方法 所有入选两组患者均进行空腹采血,离心分离血清,采用贝克曼-奥林巴斯 AU2700 全自动生化分析仪进行测定。GERD 患者组入选病例分别在治疗前、治疗后 6 个月、12 个月、18 个月和 24 个月 5 次采血进行检查并进行内镜检查,内镜检查结果仅限于筛选入组病例。健康对照组予以同期采血。项目包括:全血细胞分析、血糖血脂检查、甲状腺功能测定、病毒性肝炎检测和维生素 B₁₂ 和血清铁的水平测定,以便筛