

• 临床检验研究论著 •

实时 PCR 和 PCR-RDB 法检测人乳头瘤病毒的比对研究^{*}

肖克林, 严泽浩, 罗茗月, 麦光兴, 陈 熙, 熊礼宽
(深圳市宝安区妇幼保健院中心实验室, 广东深圳 518133)

摘要:目的 比较实时 PCR 法和 PCR-反向点杂交法(PCR-RDB)检测 HPV 的一致性。方法 收集 109 份女性生殖道样本, 利用实时 PCR 法和 PCR-RDB 法分别检测 HPV 感染和基因型分布情况, 不一致样本采用 PCR-悬浮芯片杂交法复检。结果 83.5%(91/109)的样本两种方法结果一致($kappa=0.671$), 18 例不一致样本 PCR-悬浮芯片杂交法复检显示 7 例与实时 PCR 相符, 11 例与 PCR-RDB 相符; 高、低病毒载量组间 PCR-RDB 法的检测结果差异无统计学意义($\chi^2=1.476, P=0.224$)。结论 实时 PCR 和 PCR-RDB 两法用于 HPV 检测一致性一般; HPV 病毒载量在 $10^3 \sim 10^8$ 范围内时 PCR-RDB 法的阳性率较稳定。

关键词: 人乳头状瘤病毒; 实时 PCR 法; PCR-反向点杂交法; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.24.032

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)24-3373-03

Comparison of real time PCR and PCR-reverse dot blot hybridization for detection of Human papillomavirus

Xiao Kelin, Yan Zehao, Luo Mingyue, Mai Guangxing, Chen Xi, Xiong Likuan
(Shenzhen Bao'an Maternity & Child Health Hospital, Shenzhen, Guangdong 518133, China)

Abstract: **Objective** To compare real time PCR with PCR-reverse dot blot hybridization (PCR-RDB) for detecting human papillomavirus (HPV) infection in women. **Methods** A total of 109 genital specimens from women were collected in the study. All specimens were tested HPV by using real time PCR and PCR-RDB, discrepant samples were tested again by PCR-xMAP. **Results** The concordant rate was 83.5%(91/109) between real time PCR and PCR-RDB ($kappa=0.671$), the other 18 discrepant samples were retested by PCR-xMAP, 7 of those were identical with real time PCR and 11 with PCR-RDB. No differences of PCR-RDB positive rates were found between the high and low viral load groups ($\chi^2=1.476, P=0.224$). **Conclusion** It demonstrated moderate consistency between real time PCR and PCR-RDB. The HPV positive rates of PCR-RDB were stable when the viral loads were $10^3 - 10^8$.

Key words: human papillomavirus; real time polymerase chain reaction; polymerase chain reaction-reverse dot blot hybridization; genotype

高危型人乳头状瘤病毒(HR HPV)持续感染是导致宫颈癌变的主要病因之一, 监测女性生殖道 HPV 感染情况对于预防宫颈癌发生有重大意义^[1]。HPV 监测主要依靠病毒核酸检查, 检测方法包括两大类, 一类是混合不分型检测方法, 如第二代杂交捕获法(hybrid capture 2, HC2)、酶切信号放大法(Cervista HPV HR)、实时 PCR 法(real time PCR)等^[2-5], 这类方法将多种 HPV 基因型探针混合在一个反应体系, 检测结果只报告有无其包含的 HPV 基因型感染, 而无法具体分型; 另一类是分型检测方法, 如 PCR-反向点杂交法(PCR-RDB)、PCR-悬浮芯片杂交法(PCR-xMAP)等^[6-8], 这类方法能够检测出具体的 HPV 基因型, 并可区分 HPV 单一感染和混合感染。本研究中, 作者利用临床中常用的实时 PCR 和 PCR-RDB 法检测了 109 份女性生殖道标本的 HPV 感染情况, 对两种检测方法进行比较, 并且利用 PCR-悬浮芯片杂交法对结果不一致的样本进行复检, 以评价实时 PCR 和 PCR-RDB 法的准确性。

1 资料与方法

1.1 一般资料 本研究共收集了 109 份女性生殖道样本, 均采集自本院妇科宫颈专科门诊宫颈炎或疑似 HPV 感染的病人, 其中 79 例进行了宫颈细胞学检查, 58 例为细胞学异常。研究对象纳入标准: (1) 年龄为 18~60 岁的女性; (2) 有性生活史; (3) 自愿接受 HPV 病毒学检查。109 位研究对象年龄从 18~60 岁不等, 平均(35±8.7)岁, 中位年龄为 34 岁。标本采

集利用专用宫颈细胞采样器, 从研究对象宫颈口鳞、柱状细胞交界处采样, 然后放入装有保存液的样本管内送至实验室检测。

1.2 主要仪器与试剂 实时 PCR 法 HPV 检测试剂由港龙生物技术(深圳)有限公司生产, 能检测 13 种高危型 HPV (HPV16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/68), 但无法具体分型, 该法利用外标准曲线法对样本中 HPV 进行定量, 阳性阈值定为大于或等于 1.0×10^3 ^[4]; PCR-RDB 法 HPV 基因分型试剂由亚能生物技术(深圳)有限公司生产, 可同时分型检测 23 种 HPV 基因型, 包括 18 种高危型(HPV16/18/31/33/35/39/45/51/52/53/56/58/59/66/68/73/83/MM4)和 5 种低危型(HPV6/11/42/43/44), 并可鉴别是单一基因型感染还是多种基因型混合感染。PCR-悬浮芯片杂交法 HPV 基因分型试剂由上海透景生命科技有限公司生产, 可同时分型检测 26 种 HPV 基因型, 包括 19 种高危型(HPV16/18/31/33/35/39/45/52/58/26/51/55/56/59/53/66/68/82/83)和 7 种低危型(HPV6/11/40/42/44/61/73), 该方法主要用于实时定量 PCR 和 PCR-RDB 法检测结果不一致样本的复检。任意两种方法检测结果一致则认为检测结果可信。3 种方法的操作步骤均参照说明书执行。所用的仪器: MJ Opticon™ 2 实时荧光定量 PCR 仪购自美国 Bio-Rad 公司, Eppendorf mastercycler 5331 梯度 PCR 仪购自德国 Eppendorf 公司, Microfuge 22R 高速

^{*} 基金项目: 宝安区科技计划项目(2009355)。 作者简介: 肖克林, 男, 副主任技师, 主要从事临床分子诊断和相关研究。

冷冻离心机购自美国 Beckman 公司, MH-2800D 多功能恒温箱购自天津奥特赛斯公司, HB-1000 UVP 杂交炉购自美国 UVP 公司, Bio-Plex200 悬浮芯片系统购自美国 Bio-rad 公司。

1.3 统计学处理 运用 SPSS17.0 软件进行统计学分析。采用 McNemar's 检验比较两种检测方法的阳性率, 利用 *Kappa* 检验分析两种检测方法间的一致性。采用 χ^2 检验比较病毒载量高低与 PCR-RDB 法检测阳性率的关系。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 实时 PCR 法和 PCR-RDB 法 HPV 检测结果比较 109 份样本, 实时 PCR 法检测有 50 例阳性, 阳性率为 45.9%(50/109); PCR-RDB 法有 64 例阳性, 阳性率为 58.7%(64/109), 其中 58 例包含实时定量 PCR 法能够检测出的 13 种高危型。64 例 PCR-RDB 法阳性样本中, 62.5%(40 例) 为 HPV 单一基因型感染, 37.5%(24 例) 为混合感染, 见表 1(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。只针对实时 PCR 法和 PCR-RDB 法均能检测的 13 种高危型 HPV, 对两种方法进行比较, 发现有 83.5%(91/109) 的样本结果一致, 两种方法检测结果差异无统计学意义($\chi^2=2.722, P=0.099>0.05$), 两者间的一致性一般 [*kappa* = 0.671, 95% *CI* (0.534, 0.809)]。见表 2。

表 2 实时 PCR 法和 PCR-RDB 法 13 种高危型 HPV 检测结果比较

实时 PCR	PCR-RDB*		合计
	阳性	阴性	
阳性	45	5	50
阴性	13	46	59
合计	58	51	109

*: $\chi^2=2.722, P=0.099>0.05; kappa=0.671, 95\%CI(0.534, 0.809)$ 。注: PCR-RDB; PCR-反向点杂交。

表 4 实时 PCR 法阳性标本的病毒载量与 PCR-RDB 法检测结果的关系

实时 PCR	PCR-RDB				
	<i>n</i>	阳性	阴性	13 种高危型阳性	阳性率 (%) *
高病毒载量组▲	32	31	1	30	93.8
(1.0~9.9)×10 ⁸	1	1	0	1	100.0
(1.0~9.9)×10 ⁷	2	2	0	2	100.0
(1.0~9.9)×10 ⁶	13	12	1	12	92.3
(1.0~9.9)×10 ⁵	16	16	0	16	100.0
低病毒载量组▲	18	16	2	14	77.8
(1.0~9.9)×10 ⁴	13	11	2	10	76.9
(1.0~9.9)×10 ³	5	5	0	4	80.0

PCR-RDB; PCR-反向点杂交。*: PCR-RDB 法检测实时 PCR 所包含的 13 种高危型 HPV 间的阳性率。▲: $\chi^2=1.476, P=0.224$ (高、低病毒载量两组间 PCR-RDB 法 13 种高危型 HPV 检测结果比较)。

2.2 实时 PCR 法和 PCR-RDB 法结果不一致样本复检 共有 22 份样本实时 PCR 法和 PCR-RDB 法检测结果不一致, 包括 20 例阴、阳性结果不一致和 2 例基因型不一致。除 4 例 13 种高危型以外的基因型样本无需复检外, 其余 18 例不一致样

本均利用 PCR-悬浮芯片杂交法复检。22 份样本及检测结果见表 3(见《国际检验医学杂志》网站主页“论文附件”)。

2.3 实时 PCR 法阳性标本的病毒载量与 PCR-RDB 法检测结果的关系 50 份实时 PCR 法阳性标本的病毒载量分布从 2.40×10³ 至 2.96×10⁸ 不等。PCR-RDB 法检测显示 47 份为阳性, 其中 45 份为 13 种高危型 HPV 阳性, 另外 3 例为阴性, 病毒载量分别为 1.27×10⁴, 1.37×10⁴ 和 4.62×10⁶。以一个数量级为分组单位, 依据病毒载量高低, 将 50 例实时 PCR 法阳性标本分为 6 组。不同载量组间 PCR-RDB 法检测 13 种高危型 HPV 的阳性率从 76.9%~100.0% 不等, 以 10⁵ 为分界线进行组间合并, 将 1.0×10⁵~9.9×10⁸ 合并成高病毒载量组, 1.0×10³~9.9×10⁴ 合并为低病毒载量组, 然后比较病毒载量与 PCR-RDB 法检测结果的关系。结果发现, 高、低病毒载量组间 PCR-RDB 法检测 13 种高危型 HPV 的阳性率分别为 93.8% 和 77.8%, 两组间比较差异无统计学意义($\chi^2=1.476, P=0.224$), 见表 4。

3 讨 论

近年来, 在临床检测中越来越多的实验室利用实时 PCR 法检测 HPV, 该法能够检测出 13 种高危型 HPV 基因型, 与目前 HPV 检测常用的参考方法 HC2 法高危型检测试剂相同, 但价格相对低廉, 操作也更简便、快捷。喻晶等^[9]利用 HC2 法作为参照方法研究该方法的检验效能, 发现其与 HC2 法具有良好的 consistency (*Kappa* = 0.76)。

PCR-RDB 法是目前国内常用的 HPV 基因分型检测方法, 该法能明确感染的 HPV 基因型, 对于治疗前后监测和新发感染的鉴别很有价值。李瑞珍等^[7]比较了 PCR-RDB 法与 HC2 法, 发现用于预测高度宫颈上皮内瘤样病变, 其灵敏度虽较 HC2 法低, 但特异性、阳性预测值和阴性预测值均很高。

本研究对实时 PCR 法和 PCR-RDB 法进行比较, 发现 83.5%(91/109) 的样本两种方法 13 种高危型 HPV 检测结果一致, 两种方法间的一致性一般 (*kappa* = 0.671), 有 16.5% 的样本两种方法检测结果存在差异。在不一致的样本中, 有 2 例 PCR-RDB 法显示为 HPV6 和 HPV66 的样本, 实时 PCR 法检测也为阳性, 经 PCR-悬浮芯片杂交法复检, 结果与 PCR-RDB 法一致; 有 3 例实时 PCR 阳性而 PCR-RDB 阴性, 经 PCR-液相芯片法复检显示 2 例为 HPV 阳性, 其中 1 例为 HPV56, 另 1 例为 HPV61(不属于 13 种高危型)。这些结果提示实时 PCR 法所能检测出的 HPV 基因型超过生产商所说明的 13 种高危型, 与 HPV6、61、66 存在交叉反应。另有 13 例 PCR-RDB 阳性而实时 PCR 阴性样本, 经 PCR-悬浮芯片杂交法检测显示 8 例为阳性, 均包含实时 PCR 法能够检测出的 13 种高危型。

本研究中, 依据病毒载量将 50 例实时 PCR 阳性标本分为高、低病毒载量组, 用于评价标本中的病毒载量对 PCR-RDB 法检测结果的影响, 结果发现两组间 PCR-RDB 法的阳性率差异无统计学意义 ($P=0.224$)。这一结果提示当实时 PCR 阳性标本中的 HPV 病毒载量在 10³~10⁸ 范围内时, PCR-RDB 法检测结果的阳性率较稳定。本研究中出现的 3 例实时 PCR 阳性而 PCR-RDB 法检测为 13 种高危型 HPV 阴性的标本, 可能由方法学间的差异造成。

总之, 实时 PCR 法和 PCR-RDB 法用于检测女性生殖道 HPV 感染情况, 对于宫颈癌的预防、流行病学监测和预防措施的制定有着积极的意义, 但两种方法均存在一定程度的错检或漏检, 临床中对于结果可疑的样本应结合多个方法进行检测。

门子全自动生化分析仪。(3)AFP 检测采用化学发光法,试剂购自贝克曼公司。上述三种方法学检测均严格按照试剂盒内说明书进行操作。

1.3 统计学处理 计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间均数比较应用 t 检验的方法,采用 SPSS19.0 软件进行统计处理。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 HCC、对照组血浆 VEGF 浓度与 CRP 浓度检测结果见表 1。HCC 组患者血浆 VEGF 与 CRP 浓度水平均明显高于肝硬化及对照组($P < 0.01$),AFP 以大于 25 ng/mL 为阳性,HCC 组 AFP 阳性率为 72.8 %。

表 1 HCC、NC 组血浆 VEGF 与 CRP 结果比较			
组别	<i>n</i>	VEGF(ng/L)	CRP(mg/L)
HCC 组	35	550.67±172.33*	40.64±15.58*
肝硬化组	33	178.42±94.61	22.33±13.04
对照组	32	123.11±62.37	2.73±1.41

*: $P < 0.01$,与对照组比较。

2.2 VEGF 与 AFP 联合检测对 HCC 诊断价值,见下表 2。

表 2 VEGF 与 AFP 联合检测对 HCC 诊断价值(%)			
诊断效能指标	VEGF	AFP	VEGF+AFP
敏感度	70.4	72.8	91.6
特异度	81.9	80.1	82.5
准确度	71.8	76.6	90.3

3 讨 论

VEGF 作为一类糖蛋白,其相对分子质量为 $34 \sim 46 \times 10^3$,是目前作用最强的一种促血管生长因子^[4]。本文肝癌组 VEGF 表达水平明显高于正常对照组($P < 0.05$)^[5],HCC 多发生在肝硬化的基础上,存在细菌感染、出血、脑病或明显的肝炎活动期等。两者的鉴别常有困难。从 TNM 分期来看,随着病情的发展,血浆 VEGF 有逐渐升高的趋势,HCC I 期为 (430.32 ± 162.54) ng/L,Ⅱ期为 (460.25 ± 167.42) ng/L,Ⅲ期为 (510.58 ± 175.22) ng/L,三者之间无相关性,当肿瘤发展到晚期,即第Ⅳ期,血清 VEGF 水平可高达 (550.67 ± 172.33) ng/L,与疾病的前三期之间差异有统计学意义。肝硬化患者

从代偿期向失代偿期发展,血浆 VEGF 水平也由低向高发展,差异也具有统计学意义($P < 0.05$),说明血浆 VEGF 水平的变化和肝癌、肝硬化患者病情的变化密切相关。

CRP 属急性时相蛋白,CRP 在各种肝病中均增高,究其原因可能与 CRP 本身的功能有关^[6]。本文结果 HCC 组、肝硬化组、对照组水平依次降低,且差异($P < 0.05$)。笔者在检测时也发现 HCC 组与肝硬化组存在 CRP 浓度的交叉,说明 CRP 用于肝癌与肝硬化的鉴别不具优势,AFP 是一种糖原蛋白,成年人的肝脏存在多能肝干细胞,当肝细胞发生癌变时,可合成 AFP 的肝癌细胞,在特定的细胞周期时,由于低甲基化作用使 AFP 的基因表达开放,则表现为 AFP 阳性的肝癌^[7],AFP 虽为诊断肝癌的肿瘤标志物但敏感度、准确度不太高。联合测定 VEGF 和 AFP 对 HCC 的诊断起互补作用,其阳性率可提高到 91.6 %($P < 0.05$),特异度达 80 %,准确度达 90 % 以上。因此临床工作中建议联合测定 VEGF 和 CRP、AFP 并监测数值的变化以便对 HCC 的诊断与治疗提供更大的帮助。

参考文献

[1] 夏红天,郭广宏,黄晓强,等. 肝癌患者手术前后血管内皮细胞相关细胞因子的变化[J]. 中华肝胆外科杂志,2011,17(7):554-557.

[2] 黄竹英,李松,汪平帮,等. VEGF 与 MMP-9 在原发性肝癌中的表达及意义[J]. 国际检验医学杂志,2012,33(12):1253-1256.

[3] 刘成桂,张瑞珍,丁少川,等. 联合检测 AFP 和 CEA 肿瘤标志物对原发性肝癌与转移性肝癌的鉴别诊断价值[J]. 现代检验医学杂志,2009,6(2):117-120.

[4] 王桂华,兰涛,王钊. VEGF 在肝癌中的表达及意义[J]. 中国保健营养(中旬刊),2013,12(2):233-234.

[5] Poon RT, Lau C, Pang R, et al. High serum vascular endothelial growth factor levels predict poor prognosis after radiofrequency ablation of hepatocellular carcinoma: importance of tumor biomarker in ablative therapies[J]. Ann Surg Oncol, 2007, 14(18):1835-1845.

[6] 马菊芬,李建忠. 肝病患者血清 C-反应蛋白检测及其临床意义[J]. 国际检验医学杂志, 2008, 29(7):646.

[7] 徐斌,蒋敬庭,吴昌平,等. AFP-IgM 复合物联合 AFP 对诊断肝癌的互补作用[J]. 现代检验医学杂志, 2010, 26(1):71-73.

(收稿日期:2014-09-18)

(上接第 3374 页)

参考文献

[1] 毛源,郑伟,张厚智. 人乳头瘤病毒感染的实验室诊断研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(19):2579-2581.

[2] 杜辉,吴瑞芳,汤惠茹,等. 深圳市成年女性生殖道高危型人乳头瘤病毒感染与宫颈癌患病调查[J]. 中华流行病学杂志, 2012, 33(8):799-802.

[3] 赵健,张晓光,陈锐,等. 高危型人乳头状瘤病毒 DNA 检测方法在宫颈疾病中的临床意义[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(2):149-151.

[4] 肖克林,王辉林,麦光兴,等. 多重实时 PCR 检测高危型人乳头瘤病毒感染[J]. 中华检验医学杂志, 2011, 34(6):534-537.

[5] 张海平,穆会君. 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.

[6] 韩品,王培昌. 北京地区妊娠期女性 HPV 感染调查及基因型分析[J]. 国际检验医学杂志, 2013, 34(20):2763-2765.

[7] 李瑞珍,石菊芳,周庆芝,等. 应用基因芯片技术检测高危型人乳头瘤病毒在宫颈癌筛查中的评价[J]. 中华医学杂志, 2006, 86(5):307-311.

[8] 魏炜,宋韞韬,张宝云,等. 喉鳞状细胞癌患者人乳头瘤病毒感染的检测分析[J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2013, 27(1):22-24.

[9] 喻晶,黄君美,颜存粮,等. 两种检测方法测定 13 种高危型人乳头状瘤病毒的比较研究[J]. 中华检验医学杂志, 2007, 30(10):1167-1168.

(收稿日期:2014-11-08)