

• 论 著 •

血性宫颈脱落细胞标本对 HPV 核酸分型检测结果影响的研究

葛燕梅,袁 杭,樊苏逸,毛 源[△],曹 鹏

(南京金域医学检验所 PCR 室,江苏南京 210042)

摘要:目的 探讨血性宫颈脱落细胞标本对流式荧光杂交法人乳头瘤病毒(HPV)DNA 分型检测结果的影响。方法 根据血红蛋白(Hb)水平,将宫颈脱落细胞标本分为 5 组,A 组 Hb 为 0 g/L(10 例),B 组为 0 g/L<Hb≤30 g/L(10 例),C 组为 30 g/L<Hb≤60 g/L(20 例),D 组为 60 g/L<Hb≤100 g/L(20 例),E 组为 Hb>100 g/L(20 例);每组标本中 50% 初检结果为阳性,50% 初检结果为阴性。每例标本分别取样 50、100、200、500、1 000 μL 进行检测,分析检测结果。结果 初检结果为阴性的标本、A 组 5 例初检结果阳性标本、B 组 5 例初检结果阳性标本,不同取样量检测结果一致。C、D、E 组各 10 例初检结果阳性标本中,分别有 4 例、4 例和 9 例标本,在不同取样量检测时,出现 HPV 亚型漏检。结论 血性宫颈脱落细胞标本有可能导致流式荧光杂交法 HPV 分型检测假阴性结果;有必要根据标本 Hb 水平,制定合适的取样量标准,以保证检测结果准确性。

关键词:人乳头瘤病毒; 流式荧光杂交技术; 血红蛋白; 取样量

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2017.11.021

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2017)11-1499-03

Influence of bloody cervical cell samples on HPV genotyping detectionGE Yanmei, YUANG Hang, FAN Suyi, MAO Yuan[△], CAO Peng

(Genetic Diagnosis Laboratory, Nanjing Kingmed Clinical Laboratory Co., Ltd., Nanjing, Jiangsu 210042, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of bloody cervical cell samples on human papillomavirus(HPV) genotyping detection using flowcytometry fluorescence hybridization kit. **Methods** According to the concentration of hemoglobin(Hb), cervical cell samples were divided into five groups, including group A with Hb of 0 g/L(10 cases), group B with 0 g/L<Hb≤30 g/L(10 cases), group C with 30 g/L<Hb≤60 g/L(20 cases), group D with 60 g/L<Hb≤100 g/L(20 cases) and group E with Hb>100 g/L. In each group, 50% samples were with initial positive results of HPV genotyping detection. Every sample was detected using sample volume of 50, 100, 200, 500 and 1 000 μL different volumes for testing and analysis results. **Results** For all samples with initial negative results, five samples with initial positive results in group A and five samples with initial positive results, the detected results of different sample volume were without differences. In the 10 samples, with initial positive results of group C, D and E, there were four, four and nine samples respectively, were with false negative detected results of different sample volumes. **Conclusion** Bloody cervical cell samples could cause false negative results of HPV genotyping detection using flowcytometry fluorescence hybridization kit. It might be necessary to set optimal sample volume according to the concentration of Hb for ensuring the accuracy of genotyping detection.

Key words: human papillomavirus; flowcytometry fluorescence hybridization; hemoglobin; sample volume

人乳头瘤病毒(HPV)是一种微小无包膜的环状双链 DNA 病毒,目前已发现的基因型别超过 200 种,与宫颈癌相关的型别超过 20 种^[1-3]。HPV 持续感染是宫颈癌主要的致病因素之一,可使宫颈癌发病风险增加 250 倍,且 90% 以上的浸润性宫颈癌组织可检出 HPV DNA,因此 HPV 检测是宫颈癌的重要筛查手段之一^[4-6]。流式荧光杂交技术基于编码微球和流式技术,具有高通量、灵敏度高、重复性好、操作简便等优点,是 HPV DNA 分型检测较为理想的方法^[7-8]。但关于血性宫颈脱落细胞标本对该技术 HPV DNA 分型检测结果的影响缺乏相关研究报道。本研究比较分析了不同血红蛋白(Hb)水平宫颈脱落细胞标本 HPV DNA 分型检测结果,旨在确定适合不同红细胞浓度的取样量标准。现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 一般资料 2016 年 1—5 月江苏省内医院和体检中心送检的流式荧光杂交法 HPV DNA 分型检测标本 3 658 例。收集不同 Hb 水平宫颈脱落细胞标本 80 例,按 Hb 水平分成 5

组:A 组为无血性标本 10 例,Hb 检测结果均为 0 g/L,40 例;B 组标本 10 例,Hb 水平为(>0~30)g/L;C 组标本 20 例,Hb 水平为(>30~60)g/L;D 组标本 20 例,Hb 水平为(>60~100)g/L;E 组标本 20 例,Hb 水平为大于 100 g/L。每组标本中,50% 为 HPV DNA 初次检测结果阳性标本,50% 为 HPV DNA 初次检测结果阴性标本。

1.2 方法 不同组别每份标本均分别取 50、100、200、500、1 000 μL 用于 HPV DNA 分型检测,检测方法按结果判断标准参照上海透景公司流式荧光杂交法 HPV DNA 分型检测试剂盒及杭州博日公司 E-Cycler TC96 型聚合酶链反应(PCR)扩增仪、美国 Luminex 公司 200 型流式点阵仪操作说明书。

2 结果

2.1 A 组标本检测结果 A 组标本中,5 例 HPV DNA 初次检测结果为阴性的标本不同取样量检测结果均为阴性,5 例 HPV DNA 初次检测结果为阳性的标本不同取样量检测结果均为阳性。

2.2 B 组标本检测结果 B 组标本中,5 例 HPV DNA 初次检测结果为阴性的标本不同取样量检测结果均为阴性,5 例 HPV DNA 初次检测结果为阳性的标本不同取样量检测结果见表 1,与初次检测结果完全一致。

表 1 B 组阳性标本不同取样量检测结果

标本编号	标本取样量(μL)				
	50	100	200	500	1 000
1	33+82+	33+82+	33+82+	33+82+	33+82+
2	18+82+	18+82+	18+82+	18+82+	18+82+
3	56+	56+	56+	56+	56+
4	66+	66+	66+	66+	66+
5	6+	6+	6+	6+	6+

注:表中检测结果数字表示 HPV 亚型,+表示阳性。

2.3 C 组标本检测结果 C 组标本中,10 例 HPV DNA 初次检测结果为阴性的标本不同取样量检测结果均为阴性。10 例 HPV DAN 初次检测结果为阳性的标本中,4 例标本不同取样量检测结果出现明显差异,1 号标本取样量为 50、100、200、500 μL 时检出 1 种亚型,取样量为 1 000 μL 时检出 2 种亚型;3 号标本取样量为 50、100、200 μL 时检出 1 种亚型,取样量为 500、1 000 μL 时检出 2 种亚型;6 号标本取样量为 50、100、200 μL 时检测结果为阴性,取样量为 500、1 000 μL 时检出 1 种亚型;7 号标本取样量为 50、200、500 μL 时检测结果为阴性,取样量为 100、1 000 μL 时检出 1 种亚型。C 组阳性标本不同取样量检测结果见表 2。

表 2 C 组阳性标本不同取样量检测结果

标本编号	标本取样量(μL)				
	50	100	200	500	1 000
1	18+	18+	18+	18+	18+16+
2	58+68+	58+68+	58+68+	58+68+	58+68+
3	58+	58+	58+	58+45+	58+45+
4	16+	16+	16+	16+	16+
5	16+	16+	16+	16+	16+
6	-	-	-	51+	51+
7	-	81+	-	-	81+
8	16+	16+	16+	16+	16+
9	53+	53+	53+	53+	53+
10	58+	58+	58+	58+	58+

注:表中检测结果数字表示 HPV 亚型,+表示阳性,-表示未检出任何 HPV 亚型。

2.4 D 组标本检测结果 D 组标本中,10 例 HPV DNA 初次检测结果阴性标本不同取样量检测结果均为阴性。10 例 HPV DNA 初次检测结果阳性标本中,4 例标本不同取样量检测结果出现明显差异,3 号标本取样量为 500 μL 时检出 2 种亚型,其他取样量均只检出 1 种亚型;4 号标本取样量为 100、200 μL 时检测结果为阴性,取样量为 50、500、1 000 μL 时检出 1 种亚型;6 号标本取样量为 500 μL 时检出 3 种亚型,其他取样量均检出 2 种亚型;8 号标本取样量为 50 μL 时检出 1 种亚型,其他取样量同时检出 2 种亚型。D 组阳性标本不同取样量

检测结果见表 3。

表 3 D 组阳性标本不同取样量检测结果

标本编号	标本取样量(μL)				
	50	100	200	500	1 000
1	52+	52+	52+	52+	52+
2	31+52+	31+52+	31+52+	31+52+	31+52+
3	16+	16+	16+	16+52+	16+
4	52+	-	-	52+	52+
5	51+	51+	51+	51+	51+
6	11+16+	11+16+	11+16+	11+16+18+	11+16+
7	53+	53+	53+	53+	53+
8	16+	16+81+	16+81+	16+81+	16+81+
9	39+	39+	39+	39+	39+
10	43+	43+	43+	43+	43+

注:表中检测结果数字表示 HPV 亚型,+表示阳性,-表示未检出任何 HPV 亚型。

2.5 E 组标本检测结果 E 组标本中,10 例 HPV DNA 初次检测结果阴性标本不同取样量检测结果均为阴性。10 例 HPV DNA 初次检测结果阳性标本中,9 例标本不同取样量检测结果出现明显差异,7 号标本取样量为 50、100、200 μL 时检出 1 种亚型,取样量为 500、1 000 μL 时检测结果为阴性;8 号标本取样量为 50 μL 时检出 1 种亚型,取样量为 100、200、500 μL 时检出 2 种亚型,取样量为 1 000 μL 时检测结果为阴性;其他 7 例标本取样量为 50、100、200、500 μL 时均检出 1 种亚型,取样量为 1 000 μL 时检测结果为阴性。E 组阳性标本不同取样量检测结果见表 4。

表 4 E 组阳性标本不同取样量检测结果

标本编号	标本取样量(μL)				
	50	100	200	500	1 000
1	6+	6+	6+	6+	-
2	35+53+	35+53+	35+53+	35+53+	35+53+
3	16+	16+	16+	16+	-
4	59+	59+	59+	59+	-
5	52+	52+	52+	52+	-
6	35+	35+	35+	35+	-
7	53+	53+	53+	-	-
8	18+	18+53+	18+53+	18+53+	-
9	58+	58+	58+	58+	-
10	59+	59+	59+	59+	-

注:表中检测结果数字表示 HPV 亚型,+表示阳性,-表示未检出任何 HPV 亚型。

3 讨 论

上海透景公司流式荧光杂交法 HPV 分型检测试剂盒采用通用引物对 HPV DNA 进行多重 PCR 扩增,可同时检测 27 种 HPV 亚型,包括 16、26、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68、82、6、11、40、42、43、44、55、61、81、83 亚型。检测过程中,首先对待测标本 DNA 进行 PCR 扩增,PCR 产物和微

球上交联的探针根据碱基互补配对原则进行杂交,加入荧光标记物后在流式点阵仪上检测荧光信号,从而判断 HPV 亚型检测结果。其试剂盒中明确说明:当脱落细胞标本包含较多血细胞时,有可能导致 PCR 实验失败,此时需适当减少标本量再行检测;但未明确不同量血细胞对检测结果的影响。在临床实际工作中,由于受不同医生采样手法差异,以及不同患者个体差异的影响,有可能使送检标本中含有不同量的血细胞,但实验操作者无法对此类标本进行最科学和准确的处理,导致不同实验室之间或不同技术人员之间的检测结果差异较大。

本研究首先根据 Hb 水平对脱落细胞标本进行分组,对不同分组的每份标本进行不同的取样量检测,旨在分析不同取样量对检测结果的影响。研究结果显示,Hb \leq 30 g/L 时,不同取样量标本制备的 DNA 检测结果无差异;30 g/L<Hb \leq 60 g/L 时,若取样量设为小于或等于 500 μ L,可能漏检部分 HPV 亚型,随着取样量的增加,对不同 HPV 亚型的检测灵敏度逐渐升高,因此,建议取样量为 1 000 μ L;60 g/L<Hb \leq 100 g/L 时,由于 Hb 对 PCR 扩增的影响较大,取样量设为 500 μ L 时,对不同 HPV 亚型的检出率最高;Hb>100 g/mL 时,Hb 对 PCR 扩增产生明显抑制作用,若取样量设为大于或等于 500 μ L,不同 HPV 亚型检出率明显下降,多数标本在取样为 1 000 μ L 时,检测灵敏度极低,无法检出相应的 HPV 亚型,因此,建议取样量为 200 μ L。

血性标本检测存在两个因素的影响。其一,取样量少可能导致宫颈上皮细胞不足,导致检测灵敏度降低。有研究显示,采用流式荧光杂交法进行 HPV 分型检测,当标本稀释度为 1:1 000 时,阳性率可降至 37.5%^[9]。其二,Hb 对 PCR 反应有一定的抑制作用,Hb 水平越高,对 PCR 的干扰越大,可导致假阴性结果。Hb 对 PCR 反应产生抑制作用,可能与 Hb 释放铁离子,进而干扰 DNA 合成有关^[10-11]。

本研究显示,随着 Hb 水平升高,需要减少取样量,以避免部分 HPV 亚型漏检。当宫颈脱落细胞标本 Hb 水平小于或等于 60 g/L 时,对 HPV 亚型检测的影响相对较小。为保证标本具有一定量的宫颈上皮细胞,同时考虑到实验操作的简便性,本实验室建立的取样量标准为:Hb \leq 60 g/L 时,标本取样量 1 000 μ L;60 g/L<Hb \leq 100 g/L 时,标本取样量 500 μ L;Hb>100 g/L 时,标本取样量 200 μ L。

目前常用的流式荧光杂交法 HPV 分型检测试剂盒均基于无血性宫颈脱落细胞标本确定取样量,没有针对具有不同 Hb 水平的血性标本制定相应的取样量标准,而血性标本一旦处理不当,极易导致假阴性检测结果。此外,标本中的 Hb 浓

度水平不同时,对 HPV 分型检测结果的影响存在差异。因此,需要重视不同程度血性宫颈脱落细胞标本对 HPV 分型检测结果的影响。本研究建立的取样量标准可供使用相同试剂盒的实验室作为参考。

参考文献

- [1] O'Neill LA, Sheedy FJ, McCoy CE. MicroRNAs: the fine-tuners of toll-like receptor signaling[J]. Nat Rev Immunol, 2011, 11(3): 163-175.
- [2] 李政, 刘继红. HPV 分型检测的意义[J]. 实用肿瘤杂志, 2010, 25(3): 233-236.
- [3] Cogliano V, Baan R, Straif K, et al. Carcinogenicity of human papillomavirus[J]. Lancet Oncol, 2005, 6(4): 204-210.
- [4] Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4): 244-265.
- [5] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. J Pathol, 1999, 189(1): 12-19.
- [6] 杨忠明, 丁显平, 庞博, 等. 人乳头瘤病毒 DNA 联合液基薄层细胞学检测在宫颈癌筛查诊断中的研究[J]. 成都医学院学报, 2011, 6(4): 320-323.
- [7] 钱思宇. 人乳头瘤病毒检测方法研究[J]. 实用医技杂志, 2016, 23(8): 859-861.
- [8] 邱峰, 晁艳, 袁丽娜, 等. 流式荧光杂交法检测 26 种 HPV 亚型在不同程度宫颈病变中的分布规律[J]. 临床检验杂志, 2012, 30(12): 957-959.
- [9] 崔鲂, 孟江萍, 向瑜. 流式荧光杂交技术和导流杂交基因芯片技术在 HPV 分型检测中的应用评价[J]. 临床检验杂志, 2014, 32(5): 395-397.
- [10] 沈克锋, 杨默, 江千里. 血液和骨髓标本中常见 PCR 反应抑制物的探究与分析[J]. 中国实验血液学杂志, 2014, 22(3): 842-846.
- [11] Nolan T, Hands RE, Bustin SA. Quantification of mRNA using real-time RT-PCR[J]. Nat Protoc, 2006, 1(3): 1559-1582.

(收稿日期:2016-11-28 修回日期:2017-02-17)

(上接第 1498 页)

- [18] Takahata S, Senju N, Osaki Y, et al. Amino acid substitutions in Mosaic penicillin-binding protein 2 associated with reduced susceptibility to cefixime in clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae*[J]. Antimicrob Agents Chemother, 2006, 50(11): 3638-3645.
- [19] Tomberg J, Unemo M, Davies C, et al. Molecular and structural analysis of Mosaic variants of penicillin-binding protein 2 conferring decreased susceptibility to expanded-spectrum cephalosporins in *Neisseria gonorrhoeae*; role of epistatic mutations[J]. Biochemistry, 2010, 49

(37): 8062-8070.

- [20] Whiley M, Goire N, Lambert B, et al. Reduced susceptibility to ceftriaxone in *Neisseria gonorrhoeae* is associated with mutations G542S, P551S and P551L in the gonococcal penicillin-binding protein 2[J]. J Antimicrob Chemother, 2010, 65(8): 1615-1618.
- [21] Unemo M, Shafer WM. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future[J]. Clin Microbiol Rev, 2014, 27(3): 587-613.

(收稿日期:2016-11-22 修回日期:2017-02-19)