

## • 临床研究 •

## 淮安市某医院筛查女性人乳头瘤病毒感染及基因型分布特点分析

侯海燕<sup>1</sup>, 衡春<sup>2</sup>, 陈凤丽<sup>2</sup>, 李元媛<sup>2△</sup>

(1. 江苏省淮安市疾病预防控制中心, 江苏淮安 223002; 2. 南京医科大学附属淮安第一医院中心实验室, 江苏淮安 223002)

**摘要:** 目的 分析淮安市女性人乳头瘤病毒(HPV)感染情况及基因型分布特点, 为女性 HPV 感染的检测及临床疫苗使用提供依据。方法 收集 2015 年于南京医科大学附属淮安第一医院进行 HPV 筛查的女性宫颈脱落细胞, 检测 21 种 HPV 亚型的基因分型, 分析 HPV 感染亚型及不同年龄组女性的感染特点。结果 954 例检验标本中, 阳性 247 份, 阳性率为 25.89%。共检测出 HPV 亚型 18 种, 其中高危亚型 15 种, 低危 3 种, 检出率分别为 22.22% 和 3.67%。检出率前 5 位的高危型为 HPV16、52、58、33、31; 3 种低危型别分别为 HPV11、81、6。感染类型以单一感染为主, 单一感染者高危型别检出率高于多重感染者(Fisher's 确切概率检验  $P < 0.001$ )。不同年龄段女性 HPV 阳性检出率差异有统计学意义( $\chi^2 = 33.85, P < 0.010$ ),  $>40\sim50$  岁组阳性检出率最高。不同年龄段女性高危型别及低危型别检出率差异均有统计学意义( $\chi^2 = 33.60, P < 0.001; \chi^2 = 12.07, P = 0.017$ )。结论 淮安市女性 HPV 筛查阳性者以单一感染为主, 主要高危型别为 HPV16、52 和 58;  $>40\sim50$  岁女性 HPV 阳性检出率最高。

**关键词:** 人乳头瘤病毒; 基因分型; 年龄

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.046

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)19-2773-03

宫颈癌是女性常见的恶性肿瘤之一, 其发病率逐年升高, 发病人群呈年轻化趋势<sup>[1-2]</sup>。人乳头瘤病毒(HPV)已被证明是引起宫颈癌的重要原因, 不同的 HPV 感染模式与宫颈病变的严重程度及临床病理表现有一定关联<sup>[3-5]</sup>, 但不同地区及不同人群之间 HPV 感染特征存在差异。为了解淮安地区女性 HPV 的感染特点, 本研究对淮安地区 954 例女性宫颈脱落细胞 HPV 基因型别检测结果进行分析, 并探讨不同年龄的感染特点, 以期为临幊上诊疗及疫苗研发提供合理依据。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 研究对象为 2015 年于南京医科大学附属淮安第一医院进行 HPV 感染筛查的妇女, 共 954 例。按年龄将其分为 18~30 岁,  $>30\sim40$  岁,  $>40\sim50$  岁,  $>50\sim60$  岁,  $>60$  岁 5 个年龄组。

**1.2 仪器与试剂** 由潮州凯普生物化学有限公司提供的 HPV 分型检测试剂盒和 HybriMax 医用核酸分子快速杂交仪; PCR 扩增仪为罗氏公司的 Roche Light Cycler 480。

## 1.3 方法

**1.3.1 样本采集** 暴露宫颈, 将宫颈刷置于宫颈口, 顺时针轻搓转 5 圈; 取出后放入专用保存液中, 置于 4 ℃ 冰箱保存, 并于 2 周内检测完毕。

**1.3.2 实验室检测及质量控制** 按照说明书中操作步骤, 进行 DNA 提取, 扩增; PCR 扩增产物杂交后封闭杂交膜, 加入 0.5 mL 酶标液温育 3.5 min; 彻底洗膜后, 加入 0.5 mL 显色物, 显色 3~5 min; 漂洗, 在 1 h 内分析结果。杂交膜上有 Biotin 及 IC 双质控点, Biotin 质控点监控杂交过程, IC 点监控前期 PCR 过程, 当膜条 Biotin 点与 IC 点均为阳性显色点时, 说明实验结果可信。

**1.3.3 结果判读** 若出现清晰可见的蓝紫色圆点则为阳性结果; 可根据 HPV 分型分布图判断亚型。若 Biotin 对照点和 IC 点为阳性, 其他点为阴性, 则为 HPV 阴性; 若出现 1 个以上 HPV 分型点阳性, 则为混合感染。

**1.4 统计学处理** 采用 SPSS19.0 统计软件进行数据分析。计数资料以率表示, 组间率的比较采用  $\chi^2$  检验, 不满足  $\chi^2$  检

验条件时采用 Fisher's 确切概率法, 趋势检验采用  $\chi^2$  趋势检验。检验水准  $\alpha = 0.05$ 。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 HPV 感染检出情况** 共检测标本 954 份, 其中 HPV 阳性 247 份, 阳性检出率为 25.89%。检出高危型 15 种, 检出率为 22.22% (212/954), 检出率占前 5 位的为 HPV16、52、58、33、31。检出低危型 HPV 3 种, 检出率为 3.67% (35/954), 分别为 HPV11、81、6。见表 1。

表 1 954 例筛查标本中 HPV 检出情况

HPV 各亚型	阳性检出数 (n)	阳性检出率 (%)	阳性标本中 各亚型构成比(%)
高危型			
16	81	8.49	22.75
52	47	4.93	13.20
58	45	4.72	12.64
33	24	2.52	6.74
31	23	2.41	6.46
51	17	1.78	4.78
68	17	1.78	4.78
39	16	1.68	4.49
53	14	1.47	3.93
18	13	1.36	3.65
66	7	0.73	1.97
35	5	0.52	1.40
59	5	0.52	1.40
45	3	0.31	0.84
56	3	0.31	0.84
低危型			
11	15	1.57	4.21
81	11	1.15	3.09
6	10	1.05	2.81

阳性标本中单一感染164份,占阳性标本的66.40%;多重感染83份,占33.60%。单一亚型感染人群中高危型别阳性检出率为100.00%,高于多重感染人群中高危型别检出率57.83%,差异有统计学意义(Fisher's确切概率检验 $P<0.001$ )。

## 2.2 各年龄组女性HPV检出情况 不同年龄组女性HPV

表2 不同年龄组女性HPV检出情况

年龄组 (岁)	例数 (n)	单一/多重感染数 (n/n)	检出率 (%)	亚型数 (n)	感染前3位亚型及构成比					
					第一位		第二位		第三位	
					亚型	%	亚型	%	亚型	%
18~30	247	29/11	16.19	56	HPV16	17.86	HPV52	12.50	HPV51	8.93
>30~40	306	46/20	21.57	93	HPV16	31.13	HPV58	9.68	HPV52	8.60
>40~50	324	76/41	36.11	170	HPV16	21.76	HPV58	14.71	HPV52	12.94
>50~60	54	9/8	31.48	27	HPV52	25.93	HPV58	22.22	HPV16	14.81
>60	23	4/3	30.43	10	HPV52	30.00	HPV11	10.00	HPV16	10.00
合计	954	164/83	25.89	356	HPV16	22.75	HPV52	13.20	HPV58	12.64

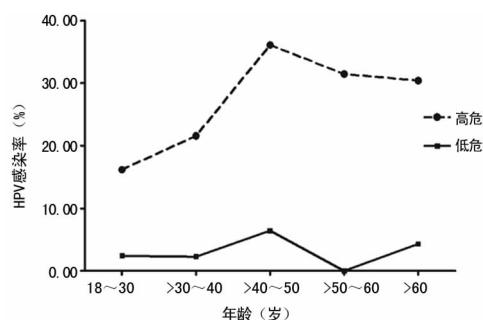


图1 不同年龄组女性筛查HPV检出情况线性图

## 3 讨论

HPV感染与宫颈癌的发生、发展及预后有关,对其进行基因型检测可为临幊上确定治疗方法、判断预后等提供依据。本研究对淮安地区954例女性进行了21种HPV分型检测,结果显示,该地区HPV感染率为25.89%,与贵州<sup>[6]</sup>、浙江<sup>[7]</sup>地的研究结果一致,但低于汕头<sup>[8]</sup>、辽宁<sup>[9]</sup>、南京<sup>[10]</sup>等地的女性HPV感染率,说明HPV感染具有一定的地域差异。进一步分析发现,不同年龄组的感染率差异有统计学意义( $P<0.05$ ),且随着年龄有先升高后下降的趋势,>40~50岁年龄组女性感染率最高,与庞艳等<sup>[11]</sup>的研究结果基本一致。近年来研究结果显示,HPV多重感染的概率逐渐增加,淮安地区的多重感染率低于单一感染率,与武汉<sup>[11]</sup>、重庆<sup>[12]</sup>的研究结果一致,宫颈癌与多重感染的相关性,目前尚无一致性结论。有研究中指出,与多重感染相比,单一感染者更易发生宫颈内严重病变<sup>[3~4]</sup>。

临床研究表明,随着HPV感染率尤其是高危型感染的增加,宫颈病变严重程度增加。淮安地区的研究结果显示,HPV高危型感染占前3位的分别为HPV16、52、58,低危型的为HPV11、81、6,与我国一项Meta分析结果一致<sup>[13]</sup>。但目前获得批准上市的HPV疫苗为葛兰素史克公司的二价疫苗和默克公司的四价疫苗,主要针对HPV16、18、11、6感染的人群。四价疫苗可使淮安地区33.42%感染HPV女性得到保护,二

阳性检出率差异有统计学意义( $\chi^2=33.85, P<0.001$ ),>40~50岁年龄组阳性检出率最高,18~30岁年龄组最低,见表2。各年龄组多重感染率随着年龄增加有上升的趋势( $\chi^2$ 趋势性检验 $P<0.001$ )。不同年龄组高危型别及低危型别检出率差异均有统计学意义( $\chi^2=33.60, P<0.001; \chi^2=12.07, P=0.017$ )。见表2、图1。

价疫苗仅为26.40%。因此,疫苗研发中应考虑到更多的基因型,使得更多女性受到保护。

综上所述,淮安地区HPV感染以>40~50岁年龄组检出率最高,主要的HPV亚型为HPV16、52、58等。因此,临幊上应积极进行HPV分型检测,对HPV感染者应给予积极治疗,以预防宫颈癌的发生。

## 参考文献

- [1] 郎景和.子宫颈癌预防的现代策略[J].中国医学科学院学报,2007,29(5):575~578.
- [2] Bruni L, Diaz M, Castellsagué M, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings[J]. J Infect Dis, 2010, 202(12):1789~1799.
- [3] 田畦,肖松舒,邓新粮,等. HPV感染与宫颈鳞癌临床病理因素的相关性分析[J].现代妇产科进展,2015,8(7):521~523.
- [4] 刘宗花,张国翔,刘香环. HPV多重感染与宫颈病变关系的初步研究[J].中国妇产科临床杂志,2015,21(5):436~437.
- [5] 冯程娟,苏东梅,刘丽娥,等.人乳头状瘤病毒HPV感染的临床实验结果分析[J].国际检验医学杂志,2015,36(7):903~905.
- [6] 袁艳,王焰,马莉,等.贵州地区8102例就诊妇女21种HPV亚型检测结果分析[J].检验医学与临床,2014,11(9):1159~1161.
- [7] 屠鸿翔,虞丹丹,陈占国,等.温州地区女性人乳头瘤病毒的感染情况及亚型分布特征分析[J].中国卫生检验杂志,2012,22(5):1065~1068.
- [8] 林广玲,翁建盛,林小荣,等.广东地区妇女下生殖道HPV亚型的基因芯片检测与分析[J].实验与检验医学,2006,24(4):303~305.
- [9] 王诗卓,王宁,魏恒,等.辽宁地区人乳头瘤病毒的感染状

- 态及其高危基因型的分布情况[J]. 中国医科大学学报, 2012, 41(2): 146-147.
- [10] 龙秀荣, 夏林, 耿建祥, 等. 女性宫颈细胞中 HPV 感染基因型别的分析[J]. 国际检验医学杂志, 2014, 35(23): 3159-3161.
- [11] 庞艳, 韩卫全. 武汉市某医院筛查女性人乳头瘤病毒感染及基因型分布特点分析[J]. 中华肿瘤防治杂志, 2015, 22(19): 1501-1504.

## • 临床研究 •

# 标本因素对荧光定量 PCR 检测 HBV-DNA 的影响

张 蓉<sup>1</sup>, 史海霞<sup>2</sup>

(1. 北京市宣武中医医院检验科, 北京 100050; 2. 中国中医科学院望京医院脾胃病科, 北京 100102)

**摘要:** 目的 分析荧光定量 PCR 法测定乙型肝炎病毒(HBV)的应用效果及标本因素对 HBV-DNA 的影响。方法 选取 2015 年 1 月至 2016 年 1 月北京市宣武中医医院收治的 10 例乙型肝炎大三阳患者作为观察对象, 所有患者经临床体检、实验室检查、影像学检查确诊为乙型肝炎大三阳, 采集患者的血清标本进行即时检测、4℃冷藏 7 d 后检测、室温保存 2 d 后检测; 高脂血、非脂血、溶血、未溶血血清标本进行荧光定量 PCR 法测定, 并采用两两配对 *t* 检验。结果 即时检测、4℃冷藏 7 d 后检测、室温保存 2 d 后检测结果比较, 差异均无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); 高脂血、非脂血、溶血、未溶血血清标本中的 HBV-DNA 水平差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ )。结论 储存时间、储存温度以及脂血、溶血对荧光定量 PCR 法测定 HBV-DNA 无较大影响, 提示荧光定量 PCR 法在测定 HBV-DNA 中具有较高的应用价值。

**关键词:** 标本因素; 荧光定量 PCR 法; 乙型肝炎病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2017.19.047

文献标识码:A

文章编号: 1673-4130(2017)19-2775-03

乙型肝炎具有发病率高、病死率高的特点, 相关统计学研究, 每年约有 100 万人死于乙型肝炎<sup>[1]</sup>。慢性乙型肝炎携带者在全球总人口中的比重超过 10%, 且有 20% 的急性乙型肝炎可能转变为慢性乙型肝炎, 并逐渐发展为肝硬化和肝癌<sup>[2]</sup>。因此, 尽早、准确地诊断对于乙型肝炎患者的早期治疗具有重要作用。但是, 随着乙型肝炎病毒(HBV)的复杂化, 临床在诊断 HBV 感染中仍存在一些问题, 有时甚至会出现漏诊的现象<sup>[3]</sup>。HBV-DNA 是直接确定 HBV 存在的重要指标, 荧光定量 PCR 法在检测 HBV-DNA 的同时, 也能够对其进行相对量化检验, 对于乙型肝炎患者体内病毒复制以及疾病传染性有更加直观的了解, 同时有助于临床诊断乙型肝炎, 选择合适的治疗方案和预后评估<sup>[4-5]</sup>。因此, 本研究主要针对荧光定量 PCR 法测定 HBV 的应用效果及标本因素对 HBV-DNA 的影响展开分析, 现报道如下。

## 1 资料与方法

**1.1 一般资料** 选取 2015 年 1 月至 2016 年 1 月北京市宣武中医医院收治的乙型肝炎大三阳患者 10 例作为研究对象, 其中男 5 例, 女 5 例; 年龄 18~52 岁, 平均 (47.5±12.6) 岁。所有患者经临床体检、实验室检查、影像学检查确诊为乙型肝炎大三阳, 即乙型肝炎病毒表面抗原(HBsAg)、乙型肝炎 e 抗原(HbeAg)以及乙型肝炎表面核心抗原(HbcAb)均为阳性。

**1.2 方法** 主要仪器: ABI730 荧光定量 MX3000P Quantitative PCR System; 希森美康 4000I 全自动血细胞分析仪; 贝克曼 AU-680 全自动生化分析仪等。主要试剂: HBV 实时荧光定量 PCR 测试试剂盒、常规血液学检测配套试剂等。采取患者的血清标本后进行即时检测、4℃冷藏 7 d 后检测、室温保存 2 d 后检测; 高脂血、非脂血, 溶血、未溶血血清标本进行荧光定量 PCR 法测定, 并采用两两配对 *t* 检验。(1) 血液标本采集。使用注射器抽取患者外周静脉血 3 mL, 然后置入枸橼酸钠试

- [12] 李永川, 徐含青, 赵娜, 等. 重庆地区 32 882 例女性宫颈人乳头瘤病毒的感染状况调查[J]. 第三军医大学学报, 2016, 38(9): 1031-1034.
- [13] 岑尧, 张翠英, 张雅丽, 等. 中国女性人乳头瘤病毒感染状况及高危型别分布的 Meta 分析[J]. 癌症进展, 2013, 11(1): 75-81.

(收稿日期: 2017-02-22 修回日期: 2017-05-21)

管, 并将试管轻轻摇晃 5~10 次, 充分混匀。(2) 细胞 DNA 提取。取 1 mL 全血标本加入 1 mL 生理盐水中, 轻微晃动使其摇匀; 另取 1 个 5 mL 离心试管, 加入 500 μL 淋巴细胞分离液, 并将稀释过的血液缓慢导入, 以 2 000 r/min 的速率离心 20 min, 离心后将中间白细胞层分离后再用 12 000 r/min 速率离心 5 min, 弃上清后将沉淀物加入 50 μL DNA 提取液后放置于 100℃ 环境中静置 10 min, 然后以 12 000 r/min 速率离心 5 min。(3) PCR 的测定。取处理好的标本使用自动 PCR 检测仪进行检测。脂血标本制作: 采集 1 mL 乳糜状的浑浊血清, 用健康者血清稀释成不同浓度的血清, 分别抽取 150 μL, 并加入 50 μL 大三阳患者血清, 其中每份采集 100 μL 进行荧光定量 PCR 测量, 共备制 10 份。溶血血清及对照血清: 采集大三阳患者血液标本, 每人血液标本分别装在 2 个试管内。一管使用振荡法制备溶血血清, 并使用全血自动分析仪测量血红蛋白水平; 另一管直接分离血清作为对照血清。取大三阳患者的血清标本, 并分装在 3 个试管中, 分别进行即时检测、4℃ 保持 7 d 检测, 以及室温保存 2 d 检测。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS16.0 统计学软件进行统计分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间差异采用独立样本 *t* 检验进行比较, 多组间比较采用方差分析, 计数资料以率表示, 采用  $\chi^2$  检验进行比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结 果

**2.1 脂血标本对 HBV-DNA 测定的影响** 脂血标本与非脂血标本的 HBV-DNA 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 1。

**2.2 溶血标本对 HBV-DNA 测定的影响** 溶血标本与非溶血标本的 HBV-DNA 比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ), 见表 2。

**2.3 不同储存时间和温度对 HBV-DNA 测定的影响** 即时