

不同保存时间和反复冻融对人乳头瘤病毒 DNA 检测结果的影响*

廖焕兰¹, 周妙姬², 冯 辉², 陈 富¹, 许振杰¹, 邱 峰^{1△} (1. 广东省中医院检验科, 广州 510120; 2. 凯普生物科技有限公司, 广东潮州 521000)

【摘要】 目的 研究不同保存时间和反复冻融对宫颈脱落细胞中人乳头瘤病毒(HPV)DNA 检测结果的影响。**方法** 收集 HPV 载量在 10^3 IU/mL、 10^5 IU/mL、 10^7 IU/mL 3 个不同水平的标本各 5 个, 混匀后分装, 分别在室温下保存 1~4 周和 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存并反复冻融 1、5、10 次后, 通过实时荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测宫颈脱落细胞中 HPV-DNA 载量, 与起始 HPV-DNA 载量进行比较分析。**结果** 标本在室温保存 4 周, 高、中、低 3 个载量水平 HPV-DNA 都无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存并反复冻融 10 次, 高、中、低 3 个载量水平 HPV-DNA 也都无明显变化, 差异无统计学意义($P>0.05$)。**结论** 适宜的细胞保存液能保持宫颈脱落细胞中 HPV-DNA 的稳定性, 能满足临床检测、复查和标本保存的需要。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 保存时间; 聚合酶链反应
DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.21.033 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)21-3024-02

人乳头瘤病毒(HPV)是一类能够感染人体皮肤及黏膜复层鳞状上皮细胞的环状双链 DNA 病毒。多项研究表明, HPV 持续感染是导致宫颈上皮内瘤变和宫颈癌发生的主要致病因素^[1-3]。目前, 随着分子生物学的发展, 高危型 HPV-DNA 的检测由于灵敏性高, 检测快速, 可定量和分型等优点, 在临床上广泛应用于宫颈疾病的筛查及治疗监测。因此, HPV-DNA 结果的准确性对疾病的分级和治疗就显得尤为重要^[4-6]。由于本单位 4 个分院的 HPV-DNA 标本皆运送至本实验室集中检测, 在保证了仪器、试剂、人员等因素稳定的前提下, 探讨不同的保存时间和保存条件对 HPV-DNA 载量检测结果是否影响。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 标本来源于 2013 年 5 月至 2013 年 8 月本院检测的 HPV-DNA 阳性标本, 选取在高(10^7 IU/mL)、中(10^5 IU/mL)、低(10^3 IU/mL)3 个不同载量的标本(高、中、低载量组)各 5 个进行以下处理, 将在专用保存液的宫颈脱落细胞标本于生物安全柜中进行分装, 每管 0.3 mL, 共分装 8 管, 其中 5 管用于室温($25\text{ }^{\circ}\text{C}$)下不同保存时间的研究, 于 1~4 周后检测; 3 管用于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行 1、5、10 次冻溶的研究。

1.2 HPV-DNA 荧光定量聚合酶链反应(PCR)检测 使用凯普生物科技有限公司的“13 种高危型人乳头状瘤病毒核酸检测试剂盒(PCR-荧光探针法)”进行提取及检测, 试剂批号 20130601。步骤按其操作说明书进行。PCR 反应体系: PCR Mix 17.5 μL , DNA 聚合酶 0.5 μL , DNA 模板 2 μL 。PCR 反应条件: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 min, 1 个循环; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 s, $58\text{ }^{\circ}\text{C}$ 50 s, 45 个循环; $40\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 s, 1 个循环。采用 Roche 公司的 Lightcycler 480 II 荧光定量 PCR 仪检测, 检测结果以 log IU/mL 表示。以大于或等于 1×10^3 IU/mL 为阳性判断标准。

1.3 试验数据可靠性 本实验室于 2010 年 12 月被卫生部临床检验中心批准为基因扩增检测实验室。本室所用凯普公司的“13 种高危型人乳头状瘤病毒核酸检测试剂盒”已获 SFDA 认证、CE 认证。试验期间本室 HPV-DNA 检测项目室内质控(批号 201303)未出现失控。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行数据分析。计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析。以

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 室温不同保存时间对 HPV-DNA 载量变化的影响 高、中、低载量 3 组中, 各个检测时间点 HPV-DNA 载量与初始结果比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 1。

表 1 室温不同保存时间 HPV-DNA 检测结果($\bar{x}\pm s$, log IU/mL)

组别	初始结果	1 周	2 周	3 周	4 周
低载量组	3.49 $\pm$ 0.23	3.60 $\pm$ 0.56*	3.27 $\pm$ 0.49*	3.50 $\pm$ 0.39*	3.76 $\pm$ 0.30*
中载量组	5.51 $\pm$ 0.18	5.30 $\pm$ 0.24*	5.40 $\pm$ 0.27*	5.16 $\pm$ 0.16*	5.09 $\pm$ 0.48*
高载量组	7.31 $\pm$ 0.28	6.94 $\pm$ 0.23*	7.19 $\pm$ 0.24*	7.26 $\pm$ 0.38*	7.23 $\pm$ 0.39*

注: 与本组内初始结果比较, * $P>0.05$ 。

2.2 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融次数对 HPV-DNA 载量变化的影响 HPV-DNA 在不同冻融次数的高、中、低载量组中载量与原初始结果比较, 差异均无统计学意义($P>0.05$)。见表 2。

表 2 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 反复冻融不同次数的 HPV-DNA 检测结果($\bar{x}\pm s$, log IU/mL)

组别	初始结果	冻融 1 次	反复冻融 5 次	反复冻融 10 次
低载量组	3.49 $\pm$ 0.23	3.41 $\pm$ 0.16*	3.69 $\pm$ 0.38*	3.41 $\pm$ 0.11*
中载量组	5.51 $\pm$ 0.18	6.04 $\pm$ 0.29*	5.97 $\pm$ 0.17*	5.66 $\pm$ 0.24*
高载量组	7.31 $\pm$ 0.28	7.35 $\pm$ 0.33*	7.43 $\pm$ 0.26*	7.12 $\pm$ 0.24*

注: 与本组内初始结果比较, * $P>0.05$ 。

3 讨 论

荧光 PCR 技术因其具有高灵敏、高特异和快速的特点, 已被广泛应用于病原体核酸的临床检测。但病毒核酸离体后易受外界环境的影响, PCR 反应过程中也容易受到标本因素的干扰。因此, 为保证检测结果的可靠性, 正确的标本采集方法、标本运送、保存等环节, 值得重视^[7-8]。

由于核酸基因扩增检测实验室对环境和技术水平的要求较高, 很多医院和实验室无法开展 PCR 检测, 只能将标本外送

* 基金项目: 广东省中医药局科研项目(20121190); 广东省人口和计划生育委员会科研项目(20133061)。
△ 通讯作者, E-mail: qfsfl@126.com。

专业检测实验室。或者有些实验室由于标本量小或恰逢节假日,几天才集中检测一批样本。但目前国内外尚无关于无病原体核酸类标本保存及处理的统一标准,因此很多临床工作者进行了研究探索。刘长利等^[9]对不同温度、不同保存时间下的 HCV-RNA 病毒稳定性进行研究,结果表明:(1)ACD 抗凝的全血在 4、25、37℃保存 48 h,病毒含量分别下降到原滴度的 53.8%、72.5%、29.8%。但 37℃保存 14 h 内,HCV-RNA 仍较为稳定;(2)ACD 抗凝全血分离后的血浆在 4℃保存 7 d,25℃保存 3 d,HCV-RNA 仍较为稳定,然而若 25℃保存 7 d,病毒含量则下降到原滴度的 25.1%;(3)血浆标本应避免多次冻融,反复冻融 3 次的血浆 HCV-RNA 病毒含量仍然较为稳定,但反复冻融 4 次,病毒含量下降到原滴度的 38.9%。李有琼等^[10]搜集 15 例 EB 病毒(EBV)DNA 阳性的标本,高、中、低载量各 5 例,分成两管,分别在室温和 4℃保存 3、5、7、9 d,然后进行检测。结果显示:在不同的保存温度下,高、中、低 3 组 EBV-DNA 载量结果比较,差异均有统计学意义($P<0.05$);但在相同的保存温度而不同保存时间里,随着时间的延长,EBV-DNA 载量有所减少,但是差异无统计学意义($P>0.05$)。李欣华等^[11]则研究证实,血清标本在室温贮存 2 d,4℃保存 1 周,-22℃保存 4 个月对 HBV-DNA 测定结果差异无统计学意义($P>0.05$)。

本研究结果显示,无论病毒载量高低,宫颈脱落细胞中 HPV-DNA 在室温下可保持稳定 1 个月;-20℃保存,即使反复冻融 10 次,各个载量水平的 HPV-DNA 检测结果与初始结果差异无统计学意义($P>0.05$)。可见,HPV-DNA 在合适的标本保存液中保存,稳定性比常规认为的要稳定得多。常规观点普遍认为,宫颈脱落细胞中 HPV-DNA 在室温仅可保持稳定 1 周,4℃保持稳定 1 个月,-20℃可长期保持稳定,但反复冻溶不能超过 3 次。然而,以上观点缺乏试验数据支持。

不同的观点和结论可能缘于细胞保存液的成分差异^[12-13]。本实验室所使用的凯普公司研制的专用细胞保存液成分包括 pH 缓冲剂、渗透压维持剂、防腐保鲜剂、固定剂、表面活化剂等。合适的缓冲液和渗透压能最大限度地保持细胞的形态完整,使之充分悬浮及分散。固定剂能固定细胞结构,保存细胞形态并避免细胞内部蛋白酶对细胞的裂解作用及核酸消化酶对核酸的消化作用,保存蛋白及核酸的完整性。同时溶液中添加的非离子表面活性剂和防腐保鲜剂,一方面可防止细胞凝聚,同时可对保存液中的细菌生理活动起到抑制作用。以上成分,对本实验室 HPV-DNA 标本的合理保存和准确检

测提供了前提和保证。各实验室可根据自身仪器设备、试剂和标本量情况制订符合自身的标本保存、处理及检测流程。

参考文献

- [1] 彭秀红,毛玲芝,邓群娣,等.人乳头瘤病毒-DNA 分型检测在年轻妇女宫颈病变诊断中的价值[J].中国生育健康杂志,2009,20(2):92-95.
- [2] 虞善芝.宫颈上皮内瘤变的临床研究进展[J].右江医学,2010,38(4):489-491.
- [3] 刘娜,王英红.HPV 与宫颈癌的关系及其检测在临床应用的进展[J].中国妇幼保健研究,2010,21(2):253-255.
- [4] 宋殿芳,邱金花,王志红.1178 例宫颈涂片细胞学检验结果分析[J].中国妇幼保健,2011,26(12):1795-1797.
- [5] 田芳.高危型 HPV 检测在筛查宫颈上皮内瘤变及监测治疗效果中的作用[J].中国社区医师:医学专业,2008,10(9):112.
- [6] 王巧燕,陈伟华.国内 HPV DNA 检测的常见方法比较[J].检验医学,2012,27(1):71-74.
- [7] 任吉莲,李晋华.影响实验室标本质量的因素[J].检验医学与临床,2006,3(2):75-76.
- [8] 颜复生,林应标,郭满容,等.血液标本的保存方法与保存时间对生化检测结果的影响[J].海南医学,2009,20(1):99-100.
- [9] 刘长利,任芙蓉,吕秋霜,等.不同处理和保存条件下体外 HCV RNA 稳定性研究[J].中国实验血液学杂志,2006,14(6):1238-1243.
- [10] 李友琼,黄慧嫔,阳文辉,等.不同保存温度和时间对 EBV-DNA 载量检测结果的影响[J].国际检验医学杂志,2013,34(7):877-878.
- [11] 李欣华,张晓梅,黄萃,等.荧光定量聚合酶链反应检测 HBV DNA 标本处理过程中的影响因素分析[J].检验医学,2006,21(2):158.
- [12] 兰旭青,王默琪,王琳.HPV-DNA 与 TCT 联合检测在宫颈早期病变筛查中的相关性研究[J].标记免疫分析与临床,2012,19(5):271-272.
- [13] 许颖,钟瑾,杨丽.宫颈液基细胞检查在临床中的应用[J].河北医药,2009,31(13):1627-1628.

(收稿日期:2014-03-15 修回日期:2014-06-26)

(上接第 3023 页)

紧张的状况。在保证献血者健康安全的前提下,为临床提供充足、安全的血液是采供血机构的责任。本研究回顾了一年多来献血者外周血的指标变化,关注的 7 个指标在首次及末次采集前都在正常值范围内,对献血者健康无明显影响。有国外报道,长期反复的 PLT 采集会导致献血者外周 PLT 降低和 PLT 生成能力下降^[5-6],这就需要采血工作者长期、持续地对献血者进行关注,以确保献血者健康。

参考文献

- [1] 张艳琼,罗宏新.多次捐献机采血小板献血者外周血常规的变化[J].检验医学与临床,2013,10(7):876-877.
- [2] 林绮文.广州地区机采血小板固定献血者外周血象的监测[J].广州医药,2011,42(6):50-52.
- [3] 葛健民,赵宏祥,任素玲,等.多次捐献机采血小板后献血

者外周血象的变化[J].国际检验医学杂志,2011,32(14):1571-1572.

- [4] 王晓华,何浩明,刘婷婷.多次单采血小板后献血者血清铁、血清铁蛋白、叶酸、VitB12 水平的变化观察[J].淮海医药,2012,30(4):338-339.
- [5] Lazarus EF, Browning J, Norman J, et al. Sustained decreases in platelet count associated with multiple, regular plateletpheresis donations[J]. Transfusion, 2001, 41(6): 756-761.
- [6] Stohlawetz P, Stiegler G, Jilma B, et al. Measurement of the levels of reticulated platelets after plateletpheresis to monitor activity of thrombopoiesis[J]. Transfusion, 1998, 38(5):454-458.

(收稿日期:2014-01-28 修回日期:2014-04-23)