

# 已婚育龄妇女HSV感染的分子流行病学调查

唐家琪 陶开华 李越希 潘秀珍 李先富 于明明

**摘要** 用PCR法和ELISA法调查了120名已婚妇女宫颈HSV感染状况。结果表明：总感染率为23.3% (28/120)；宫颈炎组和正常宫颈对照组的阳性率分别为28.9% (26/90)和6.7% (2/30)，两者有显著性差异；21~30岁组阳性率为16.7% (7/42)，31~40岁组阳性率为23.1% (12/52)，41~50岁组阳性率为34.6% (9/26)；农村组和城市组的阳性率分别为30.8% (16/52)和17.6% (12/68)；宫颈HSV感染中，HSV-2占89.3%。

**关键词** 单纯疱疹病毒 DNA聚合酶链反应 酶联免疫吸附试验

女性生殖器单纯疱疹病毒(HSV)感染是西方国家的主要性传播疾病之一。由于其对妇女、儿童健康危害颇大，近十余年来发达国家十分重视对HSV感染和流行的调查与研究<sup>[1~3]</sup>。目前我国对此尚缺乏足够的重视。我们曾用抗HSV单克隆抗体的ELISA双抗体夹心法检测HSV抗原，研究了宫颈炎、宫颈癌与HSV感染的关系<sup>[4]</sup>。最近又建立了DNA聚合酶链反应(PCR)，对HSV核酸进行检测和分型<sup>[5]</sup>。现用上述两方法对已婚妇女生殖器HSV感染状况进行调查。

## 材料和方法

一、调查对象：1992年妇女病普查时，由南京市白下区妇幼保健所、江浦县妇幼保健所和六合县妇幼保健所随机选定。包括Ⅰ°、Ⅱ°、Ⅲ°宫颈炎患者及正常宫颈者各30人，共120人。其中年龄为21~30岁者42人，31~40岁者52人，41~50岁者26人；农村人口52人，城市人口68人；未生育者33人，已生育者82人。

二、标本的采集和处理：刮取宫颈分泌物及脱落细胞，将其溶于0.01mol/L pH7.4的PBS1.5ml中。每份标本取出0.5ml，-20℃保存，用于ELISA检测。剩余部分4℃2000r/min离心15分钟；弃上清，用TE溶液50μl溶解沉淀，煮沸15分钟裂解细胞，4℃10000r/

min离心20分钟，取上清，加2倍体积的冷无水乙醇，置-70℃20分钟；4℃10000r/min离心20分钟，弃去上清，将DNA沉淀溶于无菌去离子水10μl中，煮沸变性10分钟后立即放-20℃保存，用于PCR检测。

三、PCR引物的设计与合成：根据引物设计原则和计算机处理结果，引物选于DNA多聚酶编码区。左侧引物同源于HSV-1DNA多聚酶基因的1944-1960段，为5'-AAGGAGGCGCCCAAGCG-3'，与HSV-2相应段的同源性为15/17；右侧引物互补于HSV-1DNA多聚酶基因的2166-2149段，为5'-GGTACAGGCTGGCAAAGT-3'，与HSV-2相应段的同源性为18/18。上述寡核苷酸用Biosystem331A型DNA合成仪合成。

四、PCR操作及结果判定：PCR所用0.5ml微量离心管、试剂及热循环仪为Perkin Elmer Cetus产品。反应物包含：10×缓冲液5μl(50mmol/L KCl;10mmol/L Tris-HCl, pH8.3; 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>)，10mmol/L的dATP、dCTP、dTTP、dGTP各1μl，20μmol/L的左、右侧引物各1μl，处理过的待检标本2μl，TaqDNA聚合酶0.25μl(1.25u)，用无菌去离子水补至50μl，再加灭菌石蜡油

40 $\mu$ l。扩增程序为95 $^{\circ}$ C 1分钟，52 $^{\circ}$ C 1分钟，72 $^{\circ}$ C 1分钟，共进行36个循环。自第31个循环开始，每个循环的72 $^{\circ}$ C延伸时间递增3秒钟，最后一个循环延伸时间为8分钟。取扩增产物10 $\mu$ l，与溴酚蓝电泳上样液2 $\mu$ l混匀后作琼脂糖微量电泳。胶浓度为3%，电泳缓冲液为1 $\times$  TAE液。100V，2小时后取下胶块，用溴化乙锭(EB)染色10分钟，在紫外灯上观察DNA区带的有无，并根据区带与DNA标准Marker的位置关系，估算扩增产物的碱基数。

五、ELISA检测HSV抗原：以抗型共同性抗原的单克隆抗体1A<sub>12</sub>/2E<sub>6</sub>和1D<sub>10</sub>/2F<sub>8</sub>为捕捉抗体，依次加入检测标本、纯化的兔抗HSV、HRP-羊抗兔、底物。以P/N $\geq$ 2.0判为阳性。

六、国际标准毒株：HSV-1标准毒株为SM<sub>44</sub>株，由北京生物制品研究所引进；HSV-2标准毒株为SaV株，由成都生物制品研究所引进。上述两毒株在BHK-21-C<sub>13</sub>细胞传代，待接种病毒的细胞出现明显病变时，冻融收集细胞-20 $^{\circ}$ C保存，供PCR和ELISA试验用。

## 结 果

一、PCR与ELISA检测结果比较：两方法检测120份标本，PCR检测有28份标本获得阳性结果，ELISA检测有23份标本获阳性结果。如以PCR法的阳性检出率为100%，则ELISA法的阳性检出率为82.1%，后者的漏检率为17.9%。阳性检出率比较 $\chi^2=5.490$ ， $0.05>P>0.01$  ( $\chi^2_{0.05(1)}=3.341$ ,  $\chi^2_{0.01(1)}=6.635$ )，两方法有显著性差异(表1)。

表1 PCR与ELISA检测结果

		PCR	
		+	-
ELISA	+	23	0
	-	5	92

二、宫颈炎病变与HSV感染的关系：将PCR结果作 $\chi^2$ 检验，宫颈炎组与正常宫颈组的

$\chi^2=6.211$ ， $0.05>P>0.01$  ( $\chi^2_{0.01(1)}=6.635$ ， $\chi^2_{0.05(1)}=3.841$ )，有显著性差异。宫颈炎组I $^{\circ}$ 、II $^{\circ}$ 、III $^{\circ}$ 间的 $\chi^2=0.433$ ， $P>0.05$  ( $\chi^2_{0.05(2)}=5.991$ )，无显著性差异(表2)。

表2 宫颈炎病变与HSV感染的关系

组 别	阳性率(%)	
	PCR	ELISA
正常宫颈组	6.7(2/30)	0
I $^{\circ}$	26.7(8/30)	23.3(7/30)
II $^{\circ}$	33.3(10/30)	30(9/30)
III $^{\circ}$	26.7(8/30)	23.3(7/30)

三、不同年龄组的感染状况：PCR检测阳性率21~31岁组为16.76% (7/42)，31~40岁组为23.1% (12/52)，41~50岁组为34.6% (9/26)。感染率随年龄增长有上升趋势， $\chi^2=2.996$ ， $P>0.05$  ( $\chi^2_{0.05(2)}=5.991$ )，无显著性差异。

四、农村妇女和城市妇女感染状况：PCR检测阳性率农村组为30.8% (16/52)，城市组为17.6% (12/68)。 $\chi^2=2.836$ ， $P>0.05$  ( $\chi^2_{0.05(1)}=3.841$ )，无显著性差异。

五、未生育妇女和已生育妇女的感染状况：PCR检测阳性率未生育妇女为15.8% (6/38)，已生育妇女为26.8% (22/82)。 $\chi^2=1.769$ ， $P>0.05$  ( $\chi^2_{0.05(1)}=3.841$ )，无显著性差异。

六、宫颈感染HSV的型别分布：以HSV-1国际标准毒株SM<sub>44</sub>株及HSV-2国际标准毒株SaV株为模板进行PCR，以其PCR产物作为电泳参比物。28份PCR检测阳性标本的扩增核酸片段，电泳率与SM<sub>44</sub>株参比物一致者为3例，占10.7%；与SaV株参比物一致者25例，占89.3%。

## 讨 论

HSV感染后与机体免疫系统相互作用，发生症状疱疹时复制出大量完整病毒，产生肉

眼可见的特征性病变；发生持续感染时复制出少量完整病毒，没有特征性病变，需用IFA或ELISA等免疫学方法确诊；潜伏感染时仅有HSV传染性核酸存留于细胞核内，没有HSV抗原的产生，用免疫学方法无法检测。从理论上讲，上述三种情况均携带HSV核酸，均可用PCR方法检测。我们的研究证实了国外报道<sup>[8]</sup>：PCR可以检测出经ELISA检测HSV抗原阴性的标本中存在的HSV核酸。PCR法敏感、特异，检测结果可靠；ELISA法虽有一定比例的漏检，但其简便易行，仍不失为一种较好的方法。

慢性宫颈炎是妇科最常见的疾病，罹病宫颈呈溃疡、糜烂状，经久不愈。其病因尚不清楚。本文的结果和1984年在西安地区的调查均证实，宫颈炎组HSV感染携带率均显著高于正常对照组，提示HSV感染可能是其主要病因之一。

本组调查对象HSV核酸的携带率为23.3% (23/120)，低于国外检测抗原、抗体的报道<sup>[9]</sup>，可能与我国性行为不象西方国家那样混乱有关。HSV感染率与经济条件有关，西方国家经济条件较差的贫困阶层感染率高<sup>[1,10]</sup>。我国农村已婚妇女宫颈标本中HSV核酸携带率似乎也高于城市已婚妇女，可能与其卫生保健条件较差有关。女性生殖器官HSV感染以HSV-2为主与国外报道一致。

未生育组HSV核酸携带率为15.8% (6/38)，对这部分人群及时诊断、治疗，采取适当预防措施，可以降低新生儿受感染的机率。随着年龄增长HSV感染率和宫颈癌发病率均呈上升趋势<sup>[4]</sup>，对中年妇女感染HSV进行调查诊断，对宫颈炎、宫颈癌的预防和治疗可能有意义。为了提高我国妇幼保健水平，实现优生优育，希望有关方面对此予以足够重视。

Molecular Epidemiologic Investigation on HSV Infection among Married Women at Childbearing Age Tang Jiaqi, et al., Military Medical Research Institute

of Nanjing Command of PLA, Nanjing 210002

By PCR and ELISA, an investigation on HSV infection of cervix was carried out among 120 married women. The results indicated that the total infection rate was 23.3% (28/120). In HSV infection of cervix, HSV-2 constituted 89.3%. The positive rate of HSV in the cervicitis group and normal control group was 28.9% (26/90) and 6.7% (2/30), respectively, showing a marked difference; the positive rate in the group from 21 to 30 years old was 16.7% (7/43), from 31 to 40 was 34.6% (9/26); the positive rate in the group from rural areas was 30.8% (16/52), in the group from city was 17.6% (2/18).

Key words HSV PCR ELISA

#### 参 考 文 献

- 1 Kibrick S. Herpes simplex infection at term what to do with mother, newborn and nursery personnel. JAMA, 1980, 243: 157.
- 2 Nahmias AJ, Stalder H, Oxman M, et al. Significance of herpes simplex virus during pregnancy. Science News, 1991, 139: 398.
- 3 Rapp E, Gevometta M, Dennis B, et al. Experimental evidence for the oncogenic potential of herpes simplex virus. Cancer Res, 1976, 36: 800.
- 4 唐家琪. 单克隆抗体ELISA检测宫颈分泌物中单纯疱疹病毒抗原. 南京部队医药, 1991, (5): 53.
- 5 唐家琪, 陶开华, 李越希, 等. DNA聚合酶链反应对HSV的检测和分型. 中国公共卫生学报, 1993, 12: 74.
- 6 Tsurumi T, Brennan M, Davison P, et al. Nucleotide sequence of the DNA polymerase gene of herpes simplex virus type 2 and comparison with the type 1 counterpart. Gene, 1987, 52: 129.
- 7 唐家琪, 沈茜, 汪美先, 等. ELISA快速检测单纯疱疹病毒抗原. 中华微生物学和免疫学杂志, 1985, 5: 150.
- 8 Aurelius E, Johansson B, Skoldenberg B, et al. Rapid diagnosis of herpes simplex encephalitis by nested polymerase chain reaction assay of cerebrospinal fluid. Lancet, 1991, 337: 189.

9 Nahmias AJ, Visintine AM. Neonatal herpes simplex virus infection, in Remington J, Klein J (eds): Infections of the fetus and newborn infant, Philadelphia, WB Saunders, 1976: 156.

10 Edouard M, Lange W, Openshaw H, et al. Application of polymerase chain reaction assays to studies of HSV latency. Interviro, 1991, 92: 91.

(收稿: 1992-09-25 修回: 1992-11-18)

## 忻州地区健康人群计划免疫相关疾病血清流行病学监测

山西省忻州地区卫生防疫站

1991年8~10月我们对忻州市、原平和代县健康人群麻疹、脊髓灰质炎(简称脊灰)、白喉、百日咳和破伤风进行了血清流行病学监测,结果分析如下。

**一、人群麻疹抗体水平分析:**共检测594人,阳性率91.75%, GMT 9.82, 四倍增长率47.81%。25~39岁阳性率最高(96.13%), 2~4岁最低(88.77%), 各组间无显著差异( $\chi^2=6.46, P>0.05$ )。6~8岁 GMT最高(13.12), 2~4岁最低(6.81), 差异非常显著( $F=11.08, P<0.01$ )。结果看出人群麻疹免疫水平高,能阻止麻疹的流行,与我区1988年以来麻疹低发病率(10~1.67/10万)相一致。

**二、人群脊灰抗体水平分析:**共检测577人,抗体阳性率I、II、III型分别为55.81%、30.67%、79.20%; GMT分别为34.67、6.12、216.30,有非常显著性差异( $\chi^2=274.8, P<0.005; F=183.9, P<0.01$ )。结果看出人群脊灰抗体水平很低,与1991年脊灰爆发流行(发病74例)相一致。2~4岁I、II、III型阳性率最高(63.89%、40.97%、85.42%), 13~15岁最低(44.60%、22.30%、71.22%)。GMT I、II型以2~4岁最高(66.99、11.96), 13~15岁最低(1.12、1.33), III型6~8岁最高(173.40), 25~39岁最低(2.50), 各组间差异非常显著( $P<0.01$ )。

**三、白喉、破伤风和百日咳抗体水平分析:**白破百三病分别监测558、549和529人,达保护水平分别为45.34%、48.27%和59.55%; GMT分别为0.1482(IU/ml)、0.0738(IU/ml)、185.80(滴度倒数),除白喉与破伤风保护率差异不显著外( $\chi^2=0.96, P>0.05$ ),其他两两比较均有显著差异( $P<$

0.01)。结果看出我区人群白喉、破伤风保护水平很低,百日咳保护率也低于75%,说明发生白喉的潜在危险存在,提示加强白喉免疫的必要性。白喉保护率和GMT均以2~4岁最高(80.41%, 0.4096), 25~39岁最低(15.48%, 0.0315)。破伤风也以2~4岁最高(75.50%, 0.1729), 25~39岁最低(33.12%, 0.0291),上述二病均系随年龄增大而抗体水平逐渐降低,可见大龄人群是加强的重点。百日咳保护水平和GMT以6~8岁最高(77.52%, 258.9), 25~39岁最低(46.15%, 101.4)。三病各组间保护率和GMT都有显著差异( $P<0.01$ )。小年龄高与DPT基础免疫和2、7岁加强有关,大龄低与既往未免或免疫间隔过长有关。

**四、地区免疫水平分析:**麻疹抗体阳性率和GMT以原平最高(93.68%, 29.86),代县最低(89.24%, 11.34)。脊灰阳性率I、III型代县最高(61.11%, 81.67%), II型忻州市最高(35.07%); GMT I、II型忻州市较高(79.08, 56.23), III型代县较高(294.5)。白喉保护率原平最高(52.15%),忻州市最低(33.51%), GMT代县最高(0.2282),原平最低(0.0806)。破伤风保护率代县最高(87.46%),忻州市最低(33.69%), GMT原平最高(0.0888),忻州市最低(0.0608)。百日咳保护率和GMT忻州市最高(76.16%, 242.9),原平最低(47.47%, 90.4)。结果说明我区计划免疫工作发展的不平衡性。

(梁志邦 执笔)

(收稿: 1993-02-08)