

中国西南地区人乳头瘤病毒 16 亚型基因序列分析研究

冷平^{1,2}, 朱一剑³, 丁显平¹, 周晓⁴

摘要: [目的] 分析中国西南地区 HPV16 亚型基因的序列变异特点, 探讨其与宫颈癌发生的相关性。[方法] 收集宫颈癌组织标本 12 例, 针对 HPV16 亚型分别设计 L1、E6 和 E7 基因特异性引物, 用 PCR 方法从宫颈癌组织中获得各基因的全长序列, 并构建克隆载体 pGEM-T, 进行序列分析, 同时分别以 L1、E6 和 E7 基因序列进行进化分析。[结果] 与 EG131 相比, 4 个标本中总共发现 20 个突变位点, 其中 8 个为 4 个标本所共有: 131 (G-A) (Gly-Arg)、178 (T-G) (Asp-Glu)、350 (G-T) (Val-Leu)、647 (A-G) (Asn-Asp)、846 (T-C) (同义突变)、L1 基因第 966 (C-T) (同义突变)、L1 基因第 1302 (C-T) (同义突变) 和 L1 基因第 1434 (A-G) (同义突变)。[结论] 与标准序列比较, 中国西南地区 HPV16 亚型 L1、E6 和 E7 基因存在一定范围的变异, 本研究的结果有助于对人乳头瘤病毒的生活史、传播和致癌性进行进一步的研究, 而且也有助于对特定人群设计诊断探针并为疫苗开发提供基因组学依据。

关键词: 人乳头瘤病毒; 宫颈癌; 序列分析; 系统分析

RESEARCH ON SEQUENCE VARIATIONS ANALYSIS OF HPV-16 TYPE IN SOUTHWEST OF CHINA LENG Ping, ZHU Yi-jian, DING Xian-ping, et al. (Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment, Ministry of Education; Institute of Medical Genetics, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610065, China)

Abstract: [Objective] This study was designed to analyze sequence variations in E6, E7 and L1 of HPV-16 to identify novel HPV-6 variants and correlate them with the progression of cervical cancer. [Methods] Cervical biopsies from 12 HPV-18- positive cervical neoplasia cases were analyzed by PCR for E6, E7 and L1 gene. The products of PCR were ligated into pGEM-T vector and used to transform E. coli DH5 α . At last, the sequence of the insert was determined by an automated DNA sequencer. [Results] Compared with the European-Germany131, 20 mutations were detected, of which 8 mutations were detected from all the 4 biopsies: 131 (G-A) (Gly-Arg), 178 (T-G) (Asp-Glu), 350 (G-T) (Val-Leu), 647 (A-G) (Asn-Asp), 846 (T-C) (synonymous mutation), L1 966th (C-T) (synonymous mutation), L1 1302 (C-T) (synonymous mutation) and L1 1434th (A-G) (synonymous mutation). [Conclusion] Compared with other HPV-16 reference sequence, nucleotide sequencing analysis of the HPV16 E6, E7 and L1 gene from cervical carcinoma biopsy in Southwestern China consistently shows point mutations, including synonymous mutation and nonsynonymous mutation. Above all, the results may have implications for future researches of viral persistence, transmission and oncogenic potential, developing diagnostic probe and designing vaccine or biological preparation for a particular population.

Key words: Human papillomaviruses; Cervical cancer; Sequence analysis; Phylogenetic analysis

人乳头瘤病毒 (Human papillomaviruses, HPV) 属乳头瘤多空病毒科乳头瘤病毒属, 人是其唯一宿主, 皮肤、黏膜上皮为 HPV 的易感部位。根据 HPV 基因的序列变异可将其分为多种亚型, 目前确定的 HPV 型别约有 100 余种, 其中有约 40 种可以感染人的生殖器官。研究发现, 在宫颈癌、宫颈原位癌、阴茎癌、外阴癌、肛周癌、喉乳头瘤等肿瘤组织中均可检出 HPV-DNA, 大约有 99.7% 的宫颈癌和 HPV 感染有关, 其中 HPV16 型感染率最高, 约 50% 的宫颈癌患者肿瘤组织的 DNA 为 HPV16 型。因 HPV 感染性疾病是难治性、复发性、具有潜

在致癌性的疾病, 逐渐引起人们的重视。而研制有效的 HPV 疫苗, 预防 HPV 感染和进行免疫治疗已成为国内外学者研究的热点。

中国是世界上宫颈癌的高发区之一 (大约每 10 万妇女中就有 27 例), 并且每年新增 132 300 例, 是世界上宫颈癌病人最多的国家。本文主要探讨中国西南地区宫颈癌患者中 HPV16 亚型主要基因的序列变异特点。

1 材料与方法

1.1 材料

取自四川省肿瘤医院妇产科以及重庆第四人民医院妇产科宫颈癌患者手术切除标本 102 例, 经病理确诊为浸润性宫颈癌 (包括腺癌和鳞癌), 所采用标本经反向膜杂交检测确定为 HPV16 单重感染, 排除其他型别感染以及多重感染标本, 最后选取符合要求的标本 32 例。宫颈癌组织经手术切除后, 如果不能及时提取 DNA, 则于液氮中进行保存。

1.2 菌株及主要试剂

作者简介: 冷平 (1976-), 女, 讲师, 在读硕士, 研究方向: 分子生物学

通讯作者: 丁显平, E-mail: brainding@263.net

作者单位: 1.四川大学生命科学学院遗传医学研究所, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都, 610064; 2.成都中医药大学医学技术学院; 3.出生缺陷与生殖健康重庆市市级重点实验室/重庆市人口和计划生育科学技术研究院; 4.重庆第四人民医院妇产科

DH5α 大肠杆菌细胞株为本实验室保存, 电泳凝胶片段回收试剂盒 (CONCERTTM Rapid Gel Extraction System) 购自美国 GIBCO 公司, 克隆载体连接试剂盒 (pGEM-T Easy Vector System, 内有 T4 连接酶) 和质粒提取试剂盒 (Wizard Plus Minipreps DNA Purification System) 购自美国 Promega 公司, Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶 Hind 及 BMH、DNA marker (DL2 000)、异丙基硫代-β-D 半乳糖苷 (IPTG) 和 5-溴-4-氯-3-吡啶-β-D-半乳糖苷 (X-gal)、dNTP 混合物购自大连宝生物公司。

1.3 方法

1.3.1 DNA 的提取及反向膜杂交分析 取黄豆大小新鲜临床宫颈癌标本, 剪碎后加入 pH 8.0 的 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl; 0.1 mol/L EDTA; 0.5% SDS; 20 μg/ml RNase) 500 μl, 研磨至不见组织块, 加入蛋白酶 K 至终浓度为 100~200

μg/ml。于 37℃水浴过夜, 中间振摇数次。之后用等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提两次, 再用氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提一次, 取上清加入 1/10 体积 3 M 乙酸钠和 2.5 倍体积的-20℃预冷的乙醇沉淀 DNA, 再用 70%乙醇洗涤沉淀, 自然风干, 用 100 μl ddH₂O 溶解沉淀, 稀释后-20℃存放备用。

采用反向膜杂交法对本感染 HPV 的型别进行分析, 该方法可以一次性检测 23 种 HPV 亚型的感染, 具体操作步骤参见深圳亚能公司提供的 HPV 快速检测试剂盒说明书。

1.3.2 PCR 扩增 根据 Genebank 里面已经发表的 HPV16 序列, 采用 Primer 5.0、Oligo 6.0 等生物信息学软件, 对 HPV16 E6、E7 和 L1 开放阅读框特异引物自行设计, 经 BLAST 后, 由上海英骏公司合成, 具体引物序列见表 1。

表 1 PCR 扩增引物

开放阅读框	引物名称	起始位点	引物序列	产物长度
E6	HPV16E6F	81	5'-TTATGCACCAAAAGAGAACTGCA -3'	498
	HPV16E6R	578	5'-GGTGTATCTCCATGCATGATTACAG -3'	
E7	HPV16E7F	559	5'-ATCATGCATGGAGATACACCTACATTG-3'	320
	HPV16E7R	878	5'-GCAGGATCAGCCATGGTAGATT-3'	
L1 ^a	HPV16L11F	5500	5'-ACCAAGCTCCTTCACTTCTCT-3'	545
	HPV16L11R	6044	5'-GCATAAGCACTAGCATTTTCTGT-3'	
	HPV16L12F	5955	5'-GGTAGGTCGTGCTCAGCCATTAG-3'	597
	HPV16L12R	6551	5'-TGGGCATCAGAGGTAACCATAGAAC-3'	
	HPV16L13F	6529	5'-TCTATGGTTACCTCTGATGCC-3'	660
	HPV16L13R	7188	5'-ACAAACAACACTGAGTCAACA-3'	

注: a: 由于 L1 基因序列太长, 为方便序列分析和引物设计, 将 L1 基因分成三段进行测序

PCR 反应体系 (25 μl) 为: dNTP 2.5 mmol/L, 引物各 50 μmol/L, MgCl₂ 25 mmol/L, Taq 酶 2.5 U, 加 H₂O 至 25 μl。扩增参数设定: 95℃ 5 min 变性; 94℃ 45 s, 55℃ 45 s, 72℃ 1 min, 后进行 35 个循环; 末次循环后 72℃延伸 5 min。

1.3.3 HPV16 各基因的克隆和序列分析 将 PCR 产物经含溴化乙锭的 0.7%的琼脂糖凝胶电泳后, 将含有相应片段的凝胶切下置入 1.5 ml Eppendorf 管中, 分别严格参照电泳凝胶片段回收试剂盒及表达载体连接试剂盒说明回收目的片段, 并将目的片段与克隆载体 p GEM-T Easy 连接, 构建 HPV16 各基因 pGEM-T 重组质粒, 转化至大肠杆菌 DH5α 感受态细胞中。琼脂平皿中通过蓝白筛选, 随机挑取 3 个白色单菌落扩大培养, Wizard Plus Minipreps DNA 纯化试剂盒说明书步骤提取重组质粒, 并进行 Hind 和 BamH I 双酶切鉴定。含有外源 DNA (E6、E7 和 L1) 片段的克隆为阳性克隆, 送上海英骏生物技术有限公司进行 DNA 序, 每个样品进行至少一次的重复测序。采用 DNAMAN 和 Clustal X 等生物软件对测序结果进行分析。

1.3.4 HPV16 系统进化分析, 利用 Phylip3.65、MEGA3.0 等进化分析软件, 分别以 E6、E7、L1 以及 E6+E7+L1 序列为分析对象, 对所测标本以及 EG131 (European Germany 131) (AF536179)、EA (East Asia)(AF534061)、AA (Asia-Ameri-

can)(AF402678)和 Af-1(African-1)(AF536180) 进行系统进化分析。

2 结果

2.1 反向膜杂交结果

在 12 例标本中, 11 例为 HPV 阳性, 感染率为 91.7%, 其中 4 例为 HPV16 单重感染, 详见表 2。

2.2 HPV16 致癌基因 E6E7 以及衣壳蛋白决定基因 L1 的序列变异分析

4 例 HPV16 单独感染的标本中的 HPV16 致癌基因 E6、E7 以及衣壳蛋白决定基因 L1 经序列测定, 并且与标准株 (See-dorf 等, 1985) 比较, 其中与标准株不同的位点被视为变异位点。与 EG131 相比, 4 个标本中总共发现 20 个突变位点, 其中 8 个为 4 个标本所共有。详细情况见表 3。

2.2.1 E6 基因 对于 E6 基因, 4 个标本中总共发现 4 个突变位点, 其中 3 个为 4 个标本共有, 它们分别是: 131 (G-A) (Gly-Arg)、178 (T-G) (Asp-Glu) 和 350 (G-T) (Val- Leu)。320 (A-G) (Ile-Val) 为 HUANG 所独有。

2.2.2 E7 基因 对于 E7 基因, 4 个标本中共发现 3 个突变位点, 其中两个为 4 个标本所共有, 它们分别是: 647 (A-G)

(Asn-Asp) 和 846 (T-C) (同义突变)。另外一个 843 (T-C) (同义突变)。

表 2 12 例宫颈癌标本经反向膜杂交之后的 HPV 感染情况

标本编号 ^a	HPV16	HPV18	HPV31	HPV33	HPV45	HPV58	其他 ^b
CC-01	-	-	-	-	-	-	-
CC-02	+	-	-	-	-	-	-
CC-03	-	-	+	-	-	-	-
CC-04	-	-	-	-	-	-	+
CC-05	+	-	-	+	-	-	-
CC-06	+	-	-	-	-	-	-
CC-07	-	-	-	-	-	-	-
CC-08	-	+	-	-	-	-	-
CC-09	-	-	-	-	-	+	-
CC-10	-	+	-	-	+	-	-
CC-11	+	-	-	-	-	-	-
CC-12	+	-	-	-	-	-	-

注：“+”：表示阳性；“-”：表示阴性；a：CC：Cervical Carcinoma 编号 01-12 为浸润性宫颈癌（包括腺癌和鳞癌）；b：“其他”包括本实验所用反向膜杂交试剂盒所能检测的其他类型

2.2.3 L1 基因 对于 L1 基因，共发现 13 个突变位点，3 个为 4 个标本共有：第 966 (C-T) (同义突变)、第 1 302 (C-T) (同义突变) 和第 1 434 (A-G) (同义突变)。7 个为 LEE 所独

有：第 503 (A-G) (Asp-Gly)、第 620 (A-C) (Asn-Thr)、第 627 (T-C) (同义突变)、第 648 (A-G) (同义突变)、第 736 (G-A) (Val-Ile)、第 1 113 (T-C) (同义突变) 和第 1 256 (C-G) (Ser-Cys)。第 20 (A-G) (Thr-Cys) 为 CHEN 所独有。第 112 (T-G) (Thr-Asp) 为 HUANG 所独有。第 1 508 (A-G) (Lys-Arg) 为 ZHOU 所共有。

2.3 系统进化分析

分别根据 E6、E7、L1 以及 E6-E7-L1 序列进行进化分析，其结果如图 1 所示。

3 讨论

世界范围内，宫颈癌的发病率仅次于乳腺癌而居第 2 位，每年约有 10 万宫颈癌新发病例，其中 80% 在发展中国家，我国每年约有新发病例 13.15 万，占全世界新发病例的 28.8%。近年来宫颈癌发病年龄趋向年轻化，从原来的 40-50 岁提前到 35 岁左右。人乳头瘤病毒 (HPV) 感染是诱发宫颈癌的首要启动因素，99% 以上的宫颈癌组织携带高危 HPV DNA，其中 HPV 16 型占 60% 以上^[1]。由于 HPV 是宫颈癌发病的关键因素，对于预防宫颈癌来说，首先还是从根源上切断 HPV 的感染，由此引起世界各国研究 HPV 疫苗的热潮，但是由于 HPV 各种亚型以及不同地区的同种亚型的基因具有高度多态性，这就要求不同地区必须针对本地区 HPV16 亚型基因的特点来研制针对本地区的 HPV 疫苗。本文主要探讨中国西南地区宫颈癌患者中 HPV16 亚型主要基因的序列变异特点。

表 3 HPV 16 E6、E7 和 L1 基因序列分析

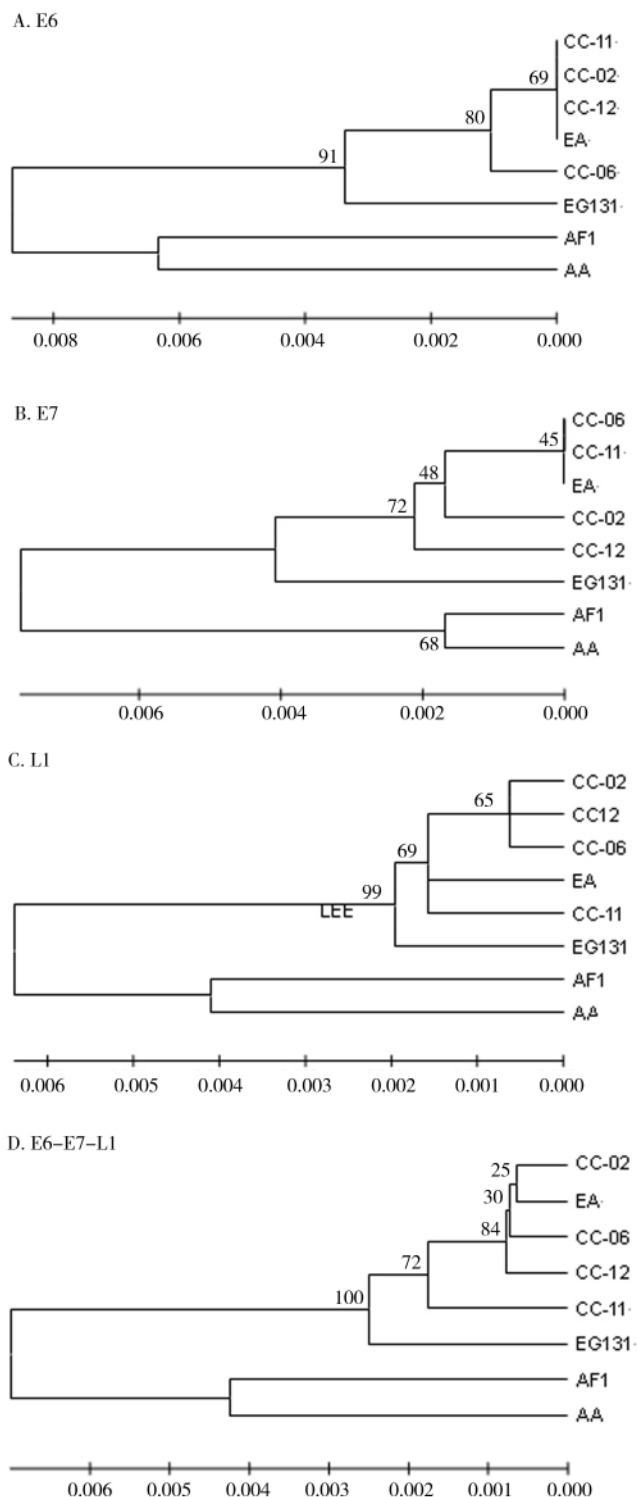
	E6 ^a	E7 ^a	L1 ^b
	1 1 1 1 2 2 3 3 3 4 5	6 7 7 8 8	1 1 3 3 3 5 5 6 6 6 6 6 7 7 8 9 9 0 0 1 1 1 2 2 2 3 3 4 4 5 5 5
	3 4 4 7 8 8 2 3 5 3 3	4 8 9 4 4	2 9 1 3 0 3 5 0 1 0 2 2 4 8 3 5 1 6 9 0 1 1 3 6 4 5 9 0 0 1 3 0 0 2
	1 3 5 8 6 9 0 5 0 3 2	7 9 5 3 6	4 0 9 2 8 4 1 1 3 0 5 0 7 8 7 6 6 4 6 9 8 7 3 5 1 3 6 4 2 5 0 4 6 8 7
AA	A C T T A G A T G A G	A C G T T	G A T T A T T C A A A C T A C G A C T T T A T C A T C T T T T A C A A
AF1	A G T T A G A T T G A	A C G T T	G A C T A T C C A G A A T A C G G T T T A G T A A A C T T C T A T A G
EG131	G C G T T A A C G G A	A T T T T	C A T T G C T T A A C A T A T G A T C C T A T A G A C C C C C A C A A
EA	A C G G T A A C T G A	G T T T C	C A T T G C T T A A C C T A T G A T T C T A T A G A C C T C C G C A A
CC-02	A C G G T A A C T G A	G T T T C	C G T T G C T T A A C A T A T G A T T C T A T A G A C C T C C G C A A
CC-11	A C G G T A A C T G A	G T T T C	C A T T G C T T G A C C C G T A A T T C T A C A G A G C T C C G C A A
CC-06	A C G G T A G C T G A	G T T T C	C A T G G C T T A A C A T A T G A T T C T A T A G A C C T C C G C A A
CC-12	A C G G T A A C T G A	G T T C C	C A T T G C T T A A C A T A T G A T T C T A T A G A C C T C C G C G A

注：AA：Asia-american；AF1：African-1；EA：East Asia；EG131：European-Germany 131；a：由于 EG131、AA、AF1 和 EA 的 E6 和 E7 开放阅读框范围均为 83-559、562-858，因此仍然采用原始位点顺序编码而其对于 L1 基因的起始范围不同但长度相同，为方便统计和比较，从 L1 基因的第一个核苷酸序列开始计算

在我们的研究中，在 12 例标本中，11 例为 HPV 阳性，感染率为 91.7%，其中 4 例为 HPV16 单重感染，另外 7 例中，3 例为单重感染，2 例为双重感染，2 例为三重感染。HPV 的多重感染是否增加或促进宫颈病变的发生一直是学者们关注的问题。多数人认为，多重感染并不增加宫颈癌的发生。在 IARC 的研究中，病例组多重感染为 81.1%，对照组为 13.19%，对照组多重感染率较高。Kay 等^[2]对南非宫颈癌和 CIN2-3 的患者进行研究发现，CIN2-3 中 HPV 双重感染为 12.4%，宫颈癌中为 16%，认为多重感染与宫颈病变的级别无

关。多重感染并不增加宫颈癌的发生率^[3]。但也有学者认为，多重感染促进宫颈病变的发生，且多重感染的宫颈癌患者对放疗的敏感性较差。有学者发现 HPV16 是双重感染中最常见的感染亚型。HPV16、18、33 常有双重感染，故认为 HPV 的多重感染与感染的 HPV 亚型有关^[4]。

HPV16E6、E7 基因是病毒的主要转化基因，其编码的 E6 蛋白及 E7 蛋白均为含“Cys-X-X-Cys”锌指结构的 DNA 结合蛋白，E6 蛋白的 N 端及 C 端各形成 2 个锌指结构，可分别结合、降解抑癌基因 p53。体外研究表明，一些 E6 突变蛋白对



注: A、B、C、D 分别代表利用 E6、E7、L1 以及 E6-E7-L1 所作的系统分析图。AA: Asia-american; AF1: African-1; EA: East Asia; EG131: European-Germany 131

图 1 中国西南地区 HPV16 亚型与其他标准株的系统分析

p53 的降解能力大大降低, 另外的一些变异则导致潜在的 T 细胞受体或者 HLA 结合区域的氨基酸变化; E7 蛋白的 C 端也存在 2 个锌指结构, N 端 37 个氨基酸残基与 AdE1A 和 SV40T 抗原蛋白相似, 可与抑癌基因蛋白 Rb 结合, 为 E7 蛋白的转化活性区。Fujnaga 等通过 PCR 法测序分析发现, 大多数侵袭性宫颈癌及癌前病变都检出了 HPV16E7 序列变异株。对于 E6E7 基因, 本研究的 4 例标本中共发现 7 个突变位点, 没有发现任

何缺失或插入突变, 在 7 个突变位点中, 5 个为 4 例标本共有: 131 (G-A)(Gly-Arg)、178 (T-G)(Asp-Glu)和 350(G-T)(Val-Leu)、647 (A-G)(Asn-Asp)和 846(T-C)(同义突变)。其中 350 (G-T)(Val-Leu)、647 (A-G)(Asn-Asp) 在国内其他研究^[5,6]中也有报道。

L1 基因为结构基因, 编码病毒的衣壳蛋白 L1 蛋白, L1 蛋白分子量约 54-58kDa, 其五聚体形式即为构成病毒外壳的壳粒, L1 基因序列具有保守性, 同时具有型特异性特征, 而且个亚型之间因地域的不同也存在一定的变异性^[7]。Touze 选取源于世界不同地区的 6 个 HPV 16 病毒株, 与原型病毒株比较, 发现 L1 蛋白氨基酸的变异可多达 15 个, 其在杆状病毒表达体系中 VLP 的产量是 1~79 倍不等。而在我们研究的 4 例标本中共发现 13 个突变位点, 未发现插入或缺失。在 13 个突变中, 3 个为 4 个标本共有, 但均为同义突变。7 个为 LEE 所独有: 其中第 627 (T-C)、第 648 (A-G)和第 1 113(T-C) 为同义突变; 第 503 (A-G)(Asp-Gly)、第 620 (A-C)(Asn-Thr)、第 736 (G-A)(Val-Ile) 和第 1256 (C-G)(Ser-Cys)。第 20 (A-G)(Thr-Cys) 为 CHEN 所独有。第 112 (T-G)(Thr-Asp) 为 HUANG 所独有。第 1 508 (A-G)(Lys-Arg) 为 ZHOU 所共有。另外, L1 基因的不同缺失突变体对 VLP 的形成也有重要的影响, 但是本研究中并没有发现任何缺失或者插入突变。

HPV 病毒无法在体外培养, 在体内也不能被诱导出易于检测的免疫反应。因此无法采用血清学检测的方法对其进行分型。HPV 分型主要是依靠病毒核酸的杂交试验及病毒基因组的物理图谱分析等方法来确定, 通常以 50%的同源性作为分型的标准。近年来, 国际病毒界又提出以病毒 L1、E6 和 E7 基因的同源性作为分型标准。如果不同毒株间上述核苷酸序列的同源性低于 90%, 则被认为属于不同的型别。尽管各 HPV16 型之间同源性很接近, 但是根据来自不同地方(欧洲、亚洲、非洲、南美洲和北美洲)的地方株的序列特点又分为 5 个分支: E (European), As (Asian), AA (Asian-American), Af-1 (African-1) 和 Af-2 (African-2)^[8]。本文采用 phyilp3.6 进化分析软件, 分别以 E6、E7、L1 以及 E6-E7-L1 为序列依据, 初步探讨中国西南地区宫颈癌组织中 HPV16 亚型的进化关系, 结果发现, 单独以 E6 基因序列即可明显区分出中国西南地区 HPV16 亚型与其他分支。

由于人乳头瘤病毒的巨大危害性, 目前设计特异性的疫苗势在必行, 而设计疫苗一般都是针对 HPV16 特异的基因序列进行的, 所以对 HPV16 亚型各主要基因进行序列分析十分必要。本项目针对中国西南地区 HPV16 亚型的主要基因进行克隆和多态性分析, 为其相应蛋白表达的后续工作奠定坚实基础, 并为进一步应用到临床判断 HPV 感染患者预后以及开发出具有预防功能的生物制剂和疫苗都具有广阔的前景和重大意义。

参考文献:

- [1] Waggoner S E. Cervical cancer [J]. The lancet, 2003, 361 (9376): 2217.
- [2] Kay P, Soeters R, Nevin J, et al. High prevalence of HPV 16 in South African women with cancer of the cervix and cervical intraepithelial neoplasia [J]. J Med Virol, 2003, 71 (2): 265-273.
- [3] An HJ, Cho NH, Lee SY, et al. Correlation of cervical carcinoma and precancerous lesions with human papillomavirus (HPV) genotypes detected with the HPV DNA chip microarray method [J]. Cancer, 2003, 97 (7): 1672-1680.

(下转第 4138 页)

《病原微生物实验室生物安全管理条例》根据病原微生物的传染性、感染后对个体或者群体的危害程度,将病原微生物分为四类。

第一类病原微生物,是指能够引起人类或者动物非常严重疾病的微生物,以及我国尚未发现或者已经宣布消灭的微生物;第二类病原微生物,是指能够引起人类或者动物严重疾病,比较容易直接或者间接在人与人、动物与人、动物与动物间传播的微生物;第三类病原微生物,是指能够引起人类或者动物疾病,但一般情况下对人、动物或者环境不构成严重危害,传播风险有限,实验室感染后很少引起严重疾病,并且具备有效治疗和预防措施的微生物;第四类病原微生物,是指在通常情况下不会引起人类或者动物疾病的微生物^[10]。

《人间传染的病原微生物名录》按照上述原则进行分类。1985 年卫生部发布的《中国医学微生物菌种保藏管理办法》将菌种分为一类、二类、三类、四类,其危险程度的大小也是从重到轻。

而与之不同的是 WHO《实验室生物安全手册》则根据感染性微生物的相对危害程度分为危险度 1 级、2 级、3 级和 4 级,其危险程度的大小是从轻到重。《实验室生物安全通用要求(GB19489-2004)》与此一致。

上述分类标准的不一致,在管理上和文献表述上引起了不必要的麻烦。

4.2 实验室安全分级

为了有效预防实验室感染的发生,WHO 提出对所有涉及感染性物质的操作应在特定等级的生物安全实验室(Biosafety Laboratory,缩写为BSL)内进行。其防护原理主要是物理隔离分区、负压通风技术(用于BSL-3实验室和BSL-4实验室)和包括生物安全柜、洗眼或喷淋装置、消毒灭菌设备等安全设备。生物安全实验室分为基础实验室(一级生物安全水平、二级生物安全水平)、防护实验室(三级生物安全水平)和最高防护实验室(四级生物安全水平)^[11]。

在《人间传染的病原微生物名录》中,将主要的病毒、细菌、放线菌、衣原体、支原体、立克次体、螺旋体和真菌等,依据其危害程度,结合不同的实验活动,制定了应在何种级别的生物安全实验室开展。这成为我国各类实验室开展日常生物安全管理、各地卫生行政部门开展备案管理的重要依据。

WHO《实验室生物安全手册》列表说明了微生物危险度等级相对应的生物安全水平、操作和设备。

4.3 实验室生物安全管理

除了实验室硬件要求外,不同等级生物安全防护实验室应有一套生物安全管理系统。实验室所在单位应设立生物安全委员会,制定各种安全规章制度。实验室应规定安全操作规程,

包括标准安全操作规程和针对不同的微生物及其毒素应补充规定的相应特殊安全操作规程,在实验室的生物安全手册中应明列并加以执行。

实验室所用个人防护装备均应符合国家有关标准的要求,在危害评估的基础上,按不同级别的防护要求选择适当的个人防护装备。实验室对个人防护装备的选择、使用、维护应有明确的书面规定、程序和使用指导。实验室应确保具备足够的有适当防护水平的清洁防护服可供使用。

安全标示是生物安全管理的一个重要手段。实验室危害物质标示目的是希望在实验内的相关人员,可以从危害物质的标示,达到认知危害与避免危害发生的目的。对实验室使用的爆炸物、易燃物、毒性物质、放射性物质、腐蚀性物质、感染性物质等应进行危险标示。对灭火器、洗眼器、消毒液等用于突发事故的物质也应明显标示,以方便取用。实验室门上张贴生物危险标示,告知生物安全等级,联系人姓名、电话等。

废弃物安全管理是防止生物安全事件的重要一环。生物安全实验室的培养物、储存物、垃圾以及其他废弃物的处理必须以安全为目的,首先应就地消毒,利器还必须置于坚固、防漏、有盖的容器,密闭后运出实验室销毁。

参考文献:

- [1] 段永翔. 微生物实验室生物安全问题 [J]. 现代预防医学, 2004, 31 (5): 658-660.
- [2] 郝广福. 医学实验室生物安全与鼠疫实验室建设 [J]. 中国国境卫生检疫杂志, 2006, 29 (增刊): 135-141.
- [3] Laboratory-Acquired West Nile Virus Infections-United States, 2002 [J]. MMWR Morb Moral Wkly Rep, 2002, 51: 1133-1135.
- [4] 袁介秋. 实验室生物安全与管理 [J]. 职业卫生与病伤, 2006, 21 (1): 38-39.
- [5] 美国 CDC/NIH. 微生物和生物医学实验室生物安全指南. 第 4 版. 美国 CDC/NIH. 1999.
- [6] WHO. 实验室生物安全手册. 第 3 版. 日内瓦: WHO, 2003.
- [7] 中华人民共和国国家标准. 实验室生物安全通用要求 (GB19489-2004) .
- [8] 中华人民共和国国家标准. 实验室生物安全通用要求 (GB19489-2008) .
- [9] 中华人民共和国国家标准. 生物安全实验室建筑技术规范 (GB50546-2004) .
- [10] 中华人民共和国国务院令. 病原微生物实验室生物安全管理条例. 2004.
- [11] 祁国明. 病原微生物实验室生物安全. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社.

(收稿日期: 2009-11-30)

(上接第 4135 页)

- [4] J del Amo, C Gonzalez and J Losana et al. Influence of age and geographical origin in the prevalence of high risk human papillomavirus in migrant female sex workers in Spain [J]. Sex. Transm. Inf, 2005, 81: 79-84.
- [5] Zuo Yagang, Wang Jiabi, Xu Xuemei, et al. The mutations and sequencing of HPV16 E6E7 gene of human papillomavirus from patients with HPV infection in Beijing [J]. Chin J Dermatol, 2003, 36 (11): 650-652

- [6] Gao Yan'e, Zhang Ju, Yan Xiaojun, et al. Cloning and sequencing of HPV16 E6 gene from cervical cancer tissues of a Chinese patient [J]. J. Xi'an Jiaotong University, 2003, (24) 1: 17-19.
- [7] Torres LA, Rojo HG, Torres RA, et al. Cervical cancer current view of its epidemiology and risk factors [J]. Gynecol Obstet Mex, 2004, 72: 466-474.
- [8] de Villiers, E. M. and C. Fauquet, et al. Classification of papillomaviruses [J]. Virology, 2004, 324: 17-27.

(收稿日期: 2010-07-20)