

• 临床检验研究 •

某市 801 例宫颈人乳头瘤病毒感染快速检测及其意义

罗福康,余娟春,李蒙,陈浩,刘畅,龙川江

(第三军医大学新桥医院检验科,重庆 400037)

摘要:目的 研究重庆市妇女宫颈人乳头瘤状病毒(HPV)亚型感染现状、分布特点及高危因素。方法 采用快速导流杂交基因芯片分型技术对2009年6月至2010年12月于本院妇产科门诊就诊的801例患者进行宫颈HPV基因型检测,并以HE染色对标本进行病理染色分析。结果 801例受检者中HPV感染总阳性率为41.82%(335/801),检测21种HPV亚型。HPV感染率在30~40岁年龄段达高峰,50岁后明显下降。在感染类型中,单一型感染率为26.2%(210/801),双重感染率为9.5%(76/801),多重感染率为6.1%(49/801)。各种宫颈病变与HPV感染率之间的关系为随宫颈疾病病变程度的加重,HPV总感染率及高危型HPV感染率均显著上升,差异有统计学意义(相关系数为0.999, $P < 0.01$)。结论 重庆市HPV感染分布以HPV-31、6、52、16和11亚型为主。HPV感染与年龄密切相关,年龄是HPV感染的一个重要的相关因素。随着宫颈疾病病变程度的加重,HPV总感染率及高危型HPV感染率均显著上升。

关键词:宫颈肿瘤; 人乳头瘤状病毒; 导流杂交

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2011.17.009

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2011)17-1934-03

Rapid detection and analysis of human papilloma virus infection in 801 cases of female patients in certain city

Luo Fukang, Yu Juanchun, Li Meng, Chen Hao, Liu Chang, Long Chuanjiang

(Department of Laboratory Medicine, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To investigate the current situation, distribution character and high risk factors of human papilloma virus (HPV) subtype infection in women of Chongqing City. **Methods** 801 cases of female outpatients in Xinqiao Hospital were enrolled and detected for HPV genotypes by DNA flow-through hybridization gene chip technique, and HE staining was performed for pathological diagnosis, between July 2009 to December 2010. **Results** The total positive rate of HPV infection was 41.82% (335/801), and 21 subtypes were found. The positive rate of HPV infection in 30 to 40 years old group was the highest, and then decreased since 50 years old. The single, double and multiple infection rates were 26.2% (210/801), 9.5% (76/801) and 6.1% (49/801) respectively. With the aggravation of cervix diseases, the positive rates of total HPV infection and high risk subtype HPV infection increased ($r=0.999, P < 0.01$). **Conclusion** The major HPV subtypes infection in Chongqing were HPV-31, 6, 52, 16 and 11. Age could be one of the risk factors of HPV infection. The cervix pathological changes could have a close relation with HPV infection and high risk HPV subtypes infection.

Key words: uterine cervical neoplasms; human papillomavirus; flow-through hybridization

宫颈癌是常见的妇科恶性肿瘤之一,其发病率在女性恶性肿瘤中居第2位,是仅次于乳腺癌而引起妇女死亡的重要病因。国际癌症研究所(IARC)公布的数据显示,2002年全球宫颈癌有49.3万新发病例和27.4万死亡病例,其中80%的新发病例发生在发展中国家,而54%发生在亚洲地区^[1-2],中国约有15万宫颈癌新发病例,占世界新发病例总数的1/3,死于宫颈癌的患者达5万人,是威胁中国妇女健康的重要原因之一。

流行病学和基础研究已经证实人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)感染是宫颈上皮内瘤变和宫颈癌的主要病因^[3-4]。目前发现超过200种HPV亚型,约40种HPV亚型感染与肛门生殖道感染有关,根据在宫颈癌发生中的危险性不同,分为高危型和低危型两大类,且不同HPV亚型的致病性和所致疾病的预后也有差异^[5-6]。目前,大量的研究证明,宫颈癌是惟一一种经过医学干预能使发病率和死亡率下降的恶性肿瘤,HPV感染检测已成为筛查和预防宫颈癌的关键问题之一^[7-8]。近年来,国内外关于HPV的研究发现,HPV感染情况及亚型分布有一定地区和人群差异,且HPV型别感染率在宫颈癌标本中也存在差异^[9]。近年的研究还发现,HPV分型检测对于了解世界不同地区型别分布以及预测将来疫苗的潜在影响具有重要意义,因此了解一个地区宫颈癌高危人群

HPV型别的分布特点、发现优势类型,对该地区宫颈癌防治工作有很重要的理论与实际意义。

1 资料与方法

1.1 一般资料 收集2009年6月至2010年12月本院妇产科门诊及住院患者801名。

1.2 仪器与试剂 采用DA7600荧光定量PCR仪(达安),Hybri Max医用核酸分子快速杂交仪(凯普),DNA提取试剂盒(凯普),人乳头瘤核酸扩增分型检测试剂盒(凯普),金属浴锅(韩国Finepcr ALB64)。

1.3 标本采集 以专用HPV取样器,插入子宫颈外口鳞柱交接部,顺时针或逆时针转动5圈,停留10s后慢慢取出取样器放入标有受试者编码的含有保存液的小瓶中(内含1mL样本处理液,能保持DNA完整性并抑制细菌生长),随后送本院检验科进行HPV DNA检测。

1.4 实验步骤 按试剂盒操作规程进行。

1.5 结果判定 操作和结果判读严格按试剂盒要求进行,肉眼观察检测结果,阳性点为蓝紫色圆点,根据阳性点在HPV芯片上的分布判断HPV亚型。每1张芯片有PCR反应质控点和杂交显色点各1个。质控点不显色提示试剂失效,或操作有误需重新做实验。出现多个阳性点为多重感染。

1.6 统计学处理 采用SPSS 13.0软件进行分析,对多重感

染者,各 HPV 亚型阳性率重复计算,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 HPV 感染率 801 例(包括宫颈尖锐湿疣)受检者中 HPV 感染总阳性率为 41.82%(335/801),检出 21 种亚型。HPV 感染率中排在前 5 位的依次为 HPV-31、6、52、16 和 11,分别为 8.23%(66/801)、7.74%(62/801)、7.49%(60/801)、5.74%(46/801) 和 5.37%(43/801)。其余依次为 HPV-58(5.11%)、HPV-33(3.87%)、HPV-53(3.74%)、HPV-68(3.6%)、HPV-Cp8304(3.6%)、HPV-18(3.1%)、HPV-39(2.24%)、HPV-51(1.74%)、HPV-35(1.62%)、HPV-56(1.12%)、HPV-42(1%)、HPV-66(1%)、HPV-44(0.62%)、HPV-43(0.49%)、HPV-59(0.49%)、HPV-45(0.12%),见表 1。

表 1 HPV 各亚型感染率

| HPV 亚型 | 阳性例数(n) | 感染率(%) |
|------------|---------|--------|
| HPV-31 | 66 | 8.23 |
| HPV-6 | 62 | 7.74 |
| HPV-52 | 60 | 7.49 |
| HPV-16 | 46 | 5.74 |
| HPV-11 | 43 | 5.37 |
| HPV-58 | 41 | 5.11 |
| HPV-33 | 31 | 3.87 |
| HPV-53 | 30 | 3.74 |
| HPV-68 | 29 | 3.62 |
| HPV-Cp8304 | 29 | 3.62 |
| HPV-18 | 25 | 3.12 |
| HPV-39 | 18 | 2.24 |
| HPV-51 | 14 | 1.74 |
| HPV-35 | 13 | 1.62 |
| HPV-56 | 9 | 1.12 |
| HPV-42 | 8 | 1.00 |
| HPV-66 | 8 | 1.00 |
| HPV-44 | 5 | 0.62 |
| HPV-43 | 4 | 0.49 |
| HPV-59 | 4 | 0.49 |
| HPV-45 | 1 | 0.12 |

表 2 HPV 感染的年龄分布及感染率

| 年龄(岁) | n | HPV 阳性数(n) | 检出率(%) |
|-------|-----|------------|--------|
| <20 | 35 | 9 | 1.10 |
| 20~30 | 265 | 115 | 14.40 |
| 30~40 | 213 | 118 | 14.70 |
| 40~50 | 200 | 74 | 9.20 |
| 50~60 | 67 | 15 | 1.90 |
| 60~70 | 15 | 3 | 0.37 |
| >70 | 6 | 1 | 0.12 |

2.2 健康妇女和宫颈 HPV 感染妇女的年龄分布及感染率,

见表 2。HPV 感染率在 30~40 岁年龄段达高峰,50 岁后明显下降,感染人群高峰年龄出现晚,但下降比较快。SPSS 13.0 软件列联表资料分析显示, $\chi^2 = 18.23, P < 0.01$,各年龄段 HPV 感染检出率差异有统计学意义。

2.3 HPV 单亚型感染和多重感染病例分布 在感染类型中,单一型感染率为 26.2%(210/801),双重感染率为 9.5%(76/801),多重感染率为 6.1%(49/801),最多出 9 种亚型的混合感染。结果见表 3。

表 3 HPV 单亚型感染和多重感染病例分布

| 多重感染次数 | 单亚型 | 双亚型 | 多亚型 | 总和 |
|--------|------|------|------|-------|
| n | 210 | 76 | 49 | 335 |
| 百分率(%) | 62.7 | 22.7 | 14.6 | 100.0 |
| 检出率(%) | 26.2 | 9.5 | 6.1 | 41.8 |

SPSS 13.0 软件列联表资料分析显示, $\chi^2 = 15.9, P < 0.01$,HPV 感染中单亚型、双亚型、多亚型感染率差异有统计学意义。

2.4 各种宫颈病变与 HPV 感染率之间的关系 统计分析显示,随宫颈疾病病变程度的加重,HPV 总感染率及高危型 HPV 感染率均显著上升(表 4),差异有统计学意义(两组 spearman 相关分析,相关系数为 0.999, $P < 0.01$)。

表 4 宫颈病变程度与 HPV 感染的关系

| 宫颈病变 | n | HPV 感染[n(%)] | 高危型 HPV 感染[n(%)] |
|---------|-----|--------------|------------------|
| 无病变 | 140 | 33(23.6) | 30(21.4) |
| 宫颈炎 | 420 | 137(32.6) | 136(30.0) |
| CIN I | 60 | 38(63.3) | 36(60.0) |
| CIN II | 29 | 25(86.2) | 24(82.8) |
| CIN III | 31 | 28(90.3) | 27(87.1) |
| 浸润癌 | 55 | 31(56.3) | 28(50.9) |
| 合计 | 735 | 292(35.2) | 271(36.9) |

3 讨 论

床旁检测(point of care test,POCT)是检验医学发展的必然产物,是医学进展和科学技术发展推动产生的仪器小型化和操作程序简便化的结晶,是当代科技信息化的反映。除早期血糖和血气 POCT 外,POCT 的检测范围逐步向各个领域扩展,如生化、免疫、微生物、生物大分子等。POCT 的目的是缩短诊断时间和治疗过程,从而降低患者医疗费用,最大化监测病情、减少并发症。HPV 检测主要依靠分子生物学方法,包括荧光定量 PCR 技术和芯片杂交技术。HPV 亚型上百种,常见的有 20 种以上,采用常规的荧光定量 PCR 技术不能准确鉴定亚型,而采用导流芯片杂交技术可在短时间内完成 21 种常见亚型的鉴别,利于疾病诊断和流行病学调查。该方法在已有 PCR 实验室基础上只需增加一台导流杂交仪即可进行检测,在条件允许的医院都可进行检测,值得推广。

HPV 感染属于流行病,其感染率和感染亚型随受检人群和检测方法不同而存在明显差异。本调查应用凯普导流杂交技术对重庆市 801 例妇女宫颈分泌物标本进行 HPV 检测,属于较大样本调查研究,具有一定的代表意义。本调查 HPV 总感染率为 41.8%,低于文献报道,分析可能由于患者载毒量较低或患者所感染亚型不在实验所能测的范围有关。感染率排

在前5位的依次为HPV-31、6、52、16和11亚型,不同于其他地区的调查结果,如:深圳地区为HPV-16、18、55亚型,广西西部地区为16、58、15、31亚型,台湾地区为HPV-52、18、58亚型,考虑为地区、民族差异所致^[10]。本研究中,在各级宫颈病变最常见的高危HPV亚型均为16、52、18、58型,符合亚洲地区HPV分布特点,排序稍有差异,有一定的地区和人群分布特点。

本组资料显示,在健康宫颈与宫颈炎中高危型HPV感染高峰主要在性生活较活跃年龄段,进一步证实高危型HPV持续感染是导致高度鳞状上皮内病变及宫颈癌的关键。年轻妇女中高危型HPV感染率很高,大多数HPV感染妇女有充足的免疫防御机制对抗病毒,在几年内可自行消退,属于一过性感染,并不一定导致宫颈癌的发生。一般来说,高危型HPV持续感染10年左右可导致癌前病变,而明确诊断宫颈癌大约在感染20年后^[11]。本组资料显示,56~60岁的妇女HPV感染率亦较高,可能年长女性由于绝经后卵巢功能的下降,雌激素水平降低,机体对外界有害因素的抵抗力减低,从而易导致HPV的感染^[12]。本结果显示随宫颈疾病及癌前病变程度加重,HPV总感染率及高危型HPV感染率均增加,其中CINⅡ~CINⅢ及宫颈癌患者中HPV感染为高危型HPV感染,而高危型HPV感染是引起宫颈癌和CIN的主要因素,从而进一步证实:高危型HPV感染与宫颈癌密切相关。本研究显示,宫颈癌患者中HPV感染主要亚型依次为16、18、52、58型,提示宫颈癌是多基因调控、多步骤、多因素综合作用的结果,不同地区、不同人群、不同方法检测所得结果可能会有一定的差异,因此了解一个地区妇女宫颈癌HPV感染分布对将来疫苗有针对性的应用有一定的指导意义。

本次HPV感染调查所获得资料可为本地区宫颈癌防治疫苗即将有针对性地选择应用提供一组可靠的数据,为干预宫颈癌的发生、发展制定相关措施提供理论依据。目前,已有两种HPV预防性疫苗上市,双价疫苗临床Ⅱ期试验表明,该两类疫苗的效果及安全性良好,在美国HPV疫苗已纳入儿童疫苗计划。本研究结果显示,宫颈癌患者主要为HPV-16、18亚型感染,其中HPV-16亚型所占比例(60.28%)最高,HPV-18亚型占19.86%,二者共占80.14%,所以在疫苗投入使用中可考虑针对HPV16/18亚型感染的宫颈癌疫苗为主,从而大幅度降低HPV感染的机会,降低宫颈癌的发病率,最终达到减少社会医疗开支的目的。另外通过本调查筛出高危型HPV

感染人群,对其追踪管理并从中早期发现宫颈癌前病变及早期浸润癌,有利于宫颈恶性肿瘤的早发现、早诊断、早治疗。

参考文献

- Broccolo F, Cocuzza CE. Automated extraction and quantitation of oncogenic HPV genotypes from cervical samples by areal-time PCR-based system[J]. J Virol Methods, 2008, 148(1-2): 48-57.
- Masia G, Mazzoleni AP, Contu G, et al. Epidemiology and genotype distribution of human papillomavirus (HPV) in women of Sardinia (Italy)[J]. Vaccine, 2009, 27(suppl1): 11-16.
- Ramzi RF, Noha IH, Hala T, et al. Validity of vaginal testing in detecting human papillomavirus (HPV) genotypes[J]. J Clinical Virology, 2000, (19): 163-168.
- Gissmann L. HPV vaccines: preclinical development[J]. Arch Med Res, 2009, 40(6): 466-470.
- Steenbergen RD, de Wilde J, Wilting SM, et al. HPV-mediated transformation of the anogenital tract[J]. J Clin Virol, 2005, 32(suppl): s25-33.
- Arbyn M, Dillner J. Review of current knowledge on HPV vaccination: An Appendix to the European guidelines for quality assurance in cervical cancer screening[J]. J Clin Virol, 2007, 38(3): 189-197.
- Stern PL, Brown M, Stacey SN, et al. Natural HPV immunity and vaccination strategies[J]. J Clin Virol, 2000, 19(1-2): 57-66.
- Reiter PL, McRee AL, Kadis JA, et al. HPV vaccine and adolescent males[J]. Vaccine, 2011, (29): 5595-5602.
- Becker-Dreps S, Otieno WA, Brewer NT, et al. HPV vaccine acceptability among Kenyan women[J]. Vaccine, 2010, 28(31): 4864-4867.
- Li J, Li LK, Ma JF, et al. Knowledge and attitudes about human papillomavirus(HPV) and HPV vaccines among women living in metropolitan and rural regions of China[J]. Vaccine, 2009, 27(8): 1210-1215.
- Wong LP. Physicians' experiences with HPV vaccine delivery: evidence from developing country with multiethnic populations [J]. Vaccine, 2009, 27(10): 1622-1627.
- 周莉,袁勇,苏晶,等.长春市妇女宫颈疾病流行现状及高危因素分析[J].中国妇幼保健,2011,26(3):350-351.

(收稿日期:2011-05-25)

医学科学研究的类型

参照联合国教科文组织关于“研究与发展”活动的分类,可将医学科学研究氛围基础研究、应用研究、实验发展三大类型。当一项研究是为获得对自然(广义的)更充分的了解,抑或要获得对新的探索领域的发现,但又没有考虑近期的实用目标时,这项研究就可以称为基础研究。应用研究是指任何旨在增加科学技术知识的创造性的系统活动,但它考虑到某一特定的实际目的。实验发展即通常所称的开发研究,是运用基础研究与应用研究及实验的知识,为了推广新材料、新产品、新设计、新流程和新方法,或为了对现有样机和中间生产进行重大改进的任何系统的创造性活动。例如:“血卟啉和光对体外细胞的生物学效应”属于基础研究,“卟啉光敏治疗肿瘤的机制研究”属于应用研究,“激光血卟啉诊治恶性肿瘤脉冲激光光源的开发和研制”属于实验发展。

——摘自《医学科研方法与论文写作》(殷国荣、王斌全、杨建一主编,科学出版社出版)