

• 临床检验研究论著 •

多重实时荧光 PCR 技术检测高危型人乳头瘤病毒的临床应用分析

张海平¹, 穆会君^{2△}, 谢平², 张滨²

(1. 南京医科大学附属无锡市第二人民医院皮肤科, 江苏无锡 214001;

2. 南京医科大学附属无锡市人民医院中心实验室, 江苏无锡 214023)

摘要:目的 探讨多重实时荧光 PCR 技术检测高危型人乳头瘤病毒(HPV)的效能。方法 应用多重实时荧光 PCR 试剂检测 200 例妇女宫颈脱落细胞高危型 HPV, 以凯普 13 种高危型人乳头状瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒为对照试剂, 对两者检测结果不一致和试验试剂 VIC 荧光通道检测显示为 HPV16 或 HPV18 阳性的样本进行 DNA 测序分析, 评价多重实时荧光 PCR 技术检测高危型 HPV 的效能。结果 200 例妇女样本中, 试验试剂和对照试剂 HPV 高危亚型检出阳性率分别为 40% 和 33%, 两种试剂对 HPV 高危亚型检出阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=33.03, P<0.01$)。试验试剂与对照试剂检测结果一致者 165 例, 两种试剂检测结果总符合率为 82.50%, 一致性指数 Kappa 值为 0.651 2。对照试剂检测为阴性, 而试验试剂检测结果为阳性的 35 例标本, 测序结果显示均为 HPV66 型。在剔除 HPV66 型样本后, 试验试剂与对照试剂结果完全一致, 总符合率为 100.00%。对照试剂检测为阳性, 且试验试剂 VIC 荧光通道阳性的标本, 测序结果显示 32 例为 HPV16 型, 4 例为 HPV18 型。结论 多重实时荧光 PCR 试剂检测高危型 HPV 具有较好的准确性和可靠性, 是检测高危型 HPV 感染的又一有效手段。

关键词: 乳头状瘤病毒科; 聚合酶链反应; 细胞诊断学

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.17.021

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)17-2256-03

Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of high risk human papillomavirus in cytological cervical samples

Zhang Haiping¹, Mu Huijun^{2△}, Xie Ping², Zhang Bin²

(1. Department of Dermatology, the Second People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214001, China;

2. Center of Clinical Laboratory, Wuxi People's Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Wuxi, Jiangsu 214023, China)

Abstract: **Objective** Evaluation of multiplex real-time PCR for detecting high risk human papillomavirus. **Methods** Cervical cytology specimens from 200 women were detected for high-risk human papillomavirus DNA with multiplex real-time fluorescence PCR kits, the samples also were detected simultaneously with high-risk HPV DNA(13 subtypes) real-time PCR diagnostic kits as control. The samples with HPV16 or HPV18 and with inconsistent result were analyzed by sequencing. **Results** Positive rate of high-risk HPV were 40% and 33% by experimental and control kits respectively. The difference between them was statistically significant($\chi^2=33.03, P<0.01$). In the 200 cases, 165 were accordant by experimental and control kits, the accordance of the two kits was 82.50%, Kappa value was 0.651 2. The 35 samples which was negative by control kits and positive by experimental kits were HPV66 certified with sequencing. The accordance of the two kits was 100.00% when the samples with HPV66 were rejected. There were 32 HPV16 and 4 HPV18 certified with sequencing in the samples which was positive in the Fam channel of control kit and in the VIC channel of experimental kit. **Conclusion** Multiplex real-time PCR kit has good accuracy and reliability for detecting high-risk HPV, it is an effective method for detecting high-risk HPV.

Key words: papillomaviridae; polymerase chain reaction; cytodiagnosis

人乳头状瘤病毒(HPV)感染,特别是高危型 HPV 的持续感染是宫颈癌发生的主要原因,及早发现和监测 HPV 感染是预防宫颈癌发生的重要手段。目前,HPV 检测技术主要依赖于以聚合酶链反应(PCR)技术为基础的分子生物学检测手段,包括实时荧光 PCR 技术、PCR-反向点杂交技术和直接测序等。本研究以凯普 13 种高危型人乳头状瘤病毒核酸扩增荧光检测试剂盒[国食药监械(准)字 2007 第 3401104 号]为对照试剂,应用多重实时荧光 PCR 方法检测 200 例妇女宫颈脱落细胞高危型 HPV 病毒 DNA,评价多重实时荧光 PCR 方法检测 HPV 高危亚型的能力。

1 资料与方法

1.1 一般资料 所有病例来源于 2011 年 8~12 月来本院妇科就诊的疑是 HPV 感染患者,年龄 18~69 岁。以窥阴器暴

露宫颈,用棉拭子擦去宫颈分泌物,然后使用专用的 HPV 宫颈刷置于宫颈口,轻轻转动宫颈刷 4~5 圈以获得足量的上皮细胞样本;慢慢取出宫颈刷,然后沿刷柄折痕处将宫颈刷柄折断,放入装有专用细胞保存液的洗脱管中浸泡,旋紧管盖,作好标志送检。

1.2 仪器与试剂 13 种高危型 HPV 核酸扩增荧光检测试剂盒购自凯普生物化学有限公司,该试剂 Fam 荧光通道能检出的 HPV 高危亚型包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68,多重实时荧光 PCR 检测人 HPV(高危型)核酸试剂盒购自申瑞生物制品有限公司,该试剂 Fam 荧光通道除了检测上述 13 种高危亚型外还能检测 HPV66 型,此外该试剂通过 VIC 荧光通道检测高危亚型是否为 HPV16 或 18 型,通过 Cy5 荧光通道检测人 β -Globin 基因作为内参,用于检验

样本采集、PCR 实验操作及试剂是否失效。Lightcycler 480 荧光 PCR 仪购自 Roche 公司。

1.3 实时荧光 PCR 实验 对 200 例妇女宫颈脱落细胞标本高危型 HPV-DNA 采用两种试剂平行检测。标本以 13 000 r/min 离心 1 min,沉淀物加入 50 μL 裂解液于 100 ℃干浴 10 min,13 000 r/min 离心 10 min,取 2 μL 上清作为 PCR 模板。对照试剂 PCR 扩增条件为 95 ℃ 10 min,95 ℃ 10 s,58 ℃ 50 s,45 个循环,58 ℃退火延伸结束后采集荧光。试验试剂 PCR 扩增条件为 95 ℃ 3 min,95 ℃ 10 s,62 ℃40 s,45 个循环,62 ℃退火延伸结束后采集荧光。结果判断为样本的 Ct 值显示为 Undet,判断为阴性;样本的 Ct≤40,判断为阳性;若为 40<Ct<45 的标本重做,重做结果 Ct<40 者为阳性,否则为阴性。

1.4 测序实验 试验和对照试剂检测结果不一致、以及

HPV16 或 18 阳性的标本用测序法验证。根据 genebank 上的序列设计 HPV66、16、18 PCR 和测序引物,引物由上海生工公司合成,HPV66、16、18 型扩增和测序引物序列见表 1。对照试剂检测为阴性,而试验试剂检测阳性的标本采用 HPV66 型特异引物进行扩增。对两种试剂检测均为阳性,且试验试剂 VIC 荧光通道阳性的标本,分别采用 HPV16 和 HPV18 特异引物进行扩增。测序 PCR 反应体系包括 5×PCR 缓冲液 10 μL,25 mmol/L MgCl₂ 4 μL,10 mmol/L dNTP 1 μL,10 μmol/L 上下游引物各 1 μL,5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.2 μL,HPV DNA 2.0 μL,加双蒸水至总体积为 50 μL。PCR 反应条件:95 ℃ 2 min,95 ℃ 15 s,58 ℃30 s,72 ℃ 30 s,35 个循环。扩增产物经 2%琼脂糖凝胶电泳确认有目的条带后,扩增产物送上海生工生物工程有限公司检测序。

表 1 HPV66、16、18 型扩增和测序引物序列

引物名称		引物序列	扩增产物(bp)
HPV66	上游引物	5'-AAT GGC ATA TGC TGG GGT AA-3'	141
	下游引物	5'-CTC CAC ATG GCG AAG GTA TT-3'	
HPV16	上游引物	5'-TAC CTA CGA CAT GGG GAG GA-3'	195
	下游引物	5'-AGC AAT TGC CTG GGA TGT TA-3'	
HPV18	上游引物	5'-GGG CAA TAT GAT GCT ACC AAA-3'	242
	下游引物	5'-GCA GCA TCC TTT TGA CAG GT-3'	

1.5 统计学处理 所有数据用 SPSS 10.0 统计软件进行分析,两种方法检测结果的差异性用 χ^2 检验,并计算两者的符合率和一致性指数(Kappa 指数),Kappa 指数大于或等于 0.75 两者一致性较好,0.75>Kappa≥0.4 两者一致性一般,Kappa<0.4 两者一致性较差。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 试验试剂和对照试剂平行实验结果 在 200 例样本中,试验试剂和对照试剂 HPV 高危型检出阳性率分别为 40%(80/200)和 33.0%(66/200),两种试剂对 HPV 高危型检出阳性率比较差异有统计学意义($\chi^2=33.03,P<0.01$)。两种试剂检测结果一致者 165 例,不相符有 35 例,阳性符合率为 100%,阴性符合率为 73.88%,总符合率为 82.50%(见表 2)。一致性指数 Kappa 值为 0.651 2,Kappa 值的 95%可信区间为 0.552 8~0.749 6,表明两种试剂在检测结果上一致性一般。需对不一致的结果进一步验证及分析,以评价试验试剂在临床上的检测结果准确度。此外,试验试剂检测的 200 例标本 Cy5 荧光通道均为阳性,显示了检验样本在采集、PCR 实验操作以及试剂的有效性。

2.2 两种试剂结果不一致标本测序验证 对照试剂检测为阴性,而试验试剂检测结果为阳性的 35 例标本,经测序比对显示均为 HPV66 型。见图 1、图 2(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。显示试验试剂临床检测结果的准确度高。剔除因对照试剂不具有检出 HPV66 型能力而导致的 35 例假阴性,对照试剂与试验试剂的检出总符合率达到 100%。

2.3 试验试剂检出 HPV16、HPV18 阳性标本的测序验证 对照和试验试剂检测结果均为阳性,且试验试剂 VIC 荧光通

道阳性的 36 例标本,测序比对分析显示 32 例为 HPV16 型,4 例为 HPV18 型。见图 1、图 3~4(见《国际检验医学杂志》网站首页“论文附件”)。显示试验试剂对 HPV16、HPV18 型的临床检测结果可靠。

表 2 多重实时荧光 PCR 试剂同对照试剂比较结果

多重荧光 PCR 试剂	对照试剂(凯普)		合计(n)	符合率(%)
	阳性(n)	阴性(n)		
阳性	66	35	101	100
阴性	0	99	99	73.88
总数	66	134	200	82.50



图 1 HPV66、16、18 型测序 PCR 产物电泳图

3 讨 论

宫颈癌是一种严重危害妇女健康的恶性肿瘤,发病率在女

性恶性肿瘤中居第二位^[1]。HPV 是宫颈癌的主要致病因子,研究发现 99.7% 以上的宫颈癌有 HPV 感染^[2-3]。依据与宫颈癌的关系,将 HPV 分为高危型和低危型,其中 HPV16、52、58 三种高危型是中国特有的优势感染型别^[4]。在以前的大样本调查研究中显示,HPV16、52、58 型占据宫颈感染病毒株的前三位,而在尖锐湿疣标本中,HPV16、18、66 型占据感染病毒株的前三位^[5]。

及早发现和监测 HPV 感染是预防宫颈癌发生的重要手段。目前,临床 HPV 检测应用广泛的技术主要有 PCR-反向点杂交法、杂交捕获法和实时荧光 PCR 技术^[6-7]。PCR-反向点杂交法具有通量高的优点,但也存在易污染、操作较繁琐的缺点^[8]。杂交捕获二代(HC-II)检测被公认为是最好的宫颈癌筛查方法,但其价格昂贵,操作也相对繁琐^[9]。实时荧光 PCR 技术具有特异性强、自动化程度高和用时短等优点,能为临床提供有效的诊断依据。

实验结果及统计分析表明,试验试剂与对照试剂相比结果符合率为 82.50%,一致性指数 Kappa 值为 0.651 2,表明一致性一般。对两种试剂检测结果不相符的标本进一步验证及分析显示,对照试剂检测为阴性,而试验试剂检测结果为阳性的 35 例标本,经测序比对显示均为 HPV66 型,在剔除 HPV66 型样本后,试验试剂与对照试剂结果完全一致,符合率为 100.00%。通过对试验试剂检测为 HPV16 或 HPV18 亚型标本的验证,显示其检测结果与 DNA 测序结果完全一致。结果表明试验试剂具有较高的临床检测准确性和可靠性。

此外,试验试剂能同时检测三个通道的荧光,通过 Cy5 荧光通道检测人 β -Globin 基因作为内参,实验结果显示检验样本在采集、PCR 实验操作以及试剂的有效性。而其 VIC 荧光通道能报告检测到的 HPV 是否为具有更高致癌性的 HPV16 或 18 型。研究表明 HPV 不同亚型致癌能力不同,HPV16、18 致病力最强,易导致宫颈的高级别病变,宫颈癌患者 HPV 感染也以 HPV16、18 最多^[10-11]。因此 HPV16 和 18 型的检出有助于对患者进行个体化评估、预测宫颈病变发生的风险。另外试验试剂还能检测 HPV66 亚型,Schiffman 通过 Meta 分析显示 HPV66 型在宫颈癌感染中占到 0.3%^[12],虽然致癌的概率不高,但由于 HPV66 型占据所有 HPV 感染病毒株的 4.25%^[5],所以 HPV66 型的有效检出也有助于 HPV 感染的防治。

综上所述,多重实时荧光 PCR 试剂检测高危型 HPV 具有较高可靠性和准确性,是检测高危型 HPV 感染的又一有效手段。

参考文献

[1] Senapathy JG, Umadevi P, Kannika PS. The present scenario of cervical cancer control and HPV epidemiology in India; an outline [J]. Asian Pac J Cancer Prev, 2011, 12(5): 1107-1115.

[2] Ibeanu OA. Molecular pathogenesis of cervical cancer [J]. Cancer Biol Ther, 2011, 11(3): 295-306.

[3] Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group [J]. J Natl Cancer Inst, 1995, 87(11): 796-802.

[4] 李霓, 代敏. 中国妇女人乳头状瘤病毒感染的多中心横断面研究 [J]. 中华疾病控制杂志, 2008, 12(5): 411-415.

[5] 穆会君, 张滨, 谢平. 无锡地区人乳头瘤病毒感染状况及基因型分析 [J]. 山东医药, 2011, 51(47): 64-65.

[6] 崔金环, 杨光, 苏锡康, 等. 实时荧光 PCR 检测检测高危型 HPV 的临床应用评价 [J]. 现代预防医学杂志, 2011, 38(23): 4948-4949.

[7] 许晓红, 解正新, 马嵘, 等. HPV 高危型别检测联合细胞学检查对宫颈病变筛查的研究 [J]. 中华实验和临床病毒学杂志, 2011, 25(4): 298-300.

[8] 王攀, 李招云, 万卫昌, 等. 两种方法 HPV 基因检测的比较 [J]. 浙江实用医学, 2011, 16(4): 306-307.

[9] 钟磊, 祝建军, 许晓燕, 等. 杂交捕获法与荧光定量 PCR 法在高危型 HPV 检测的比较 [J]. 中华检验医学杂志, 2008, 31(8): 948-949.

[10] de Sanjosé S, Diaz M, Castellsagué X, et al. Worldwide prevalence and genotype distribution of cervical human papillomavirus DNA in women with normal cytology: a meta-analysis [J]. Lancet Infect Dis, 2007, 7(7): 453-459.

[11] Bulk S, Berkhof J, Bulkman NW, et al. Preferential risk of HPV16 for squamous cell carcinoma and of HPV18 for adenocarcinoma of the cervix compared to women with normal cytology in the Netherlands [J]. Br J Cancer, 2006, 94(1): 171-175.

[12] Schiffman M, Clifford G, Buonaguro FM. Classification of weakly carcinogenic human papillomavirus types: addressing the limits of epidemiology at the borderline [J]. Infect Agent Cancer, 2009, 4(1): 8.

(收稿日期: 2013-04-08)

(上接第 2255 页)

[7] Viasus D, Garcia-Vidal C, Gudiol F, et al. Statins for community-acquired pneumonia: current state of the science [J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2010, 29(2): 143-152.

[8] Cho MC, Kim H, An D, et al. Comparison of sputum and nasopharyngeal swab specimens for molecular diagnosis of Mycoplasma pneumoniae, Chlamydia pneumoniae, and Legionella pneumophila [J]. Ann Lab Med, 2012, 32(2): 133-138.

[9] 鲁继荣, 刘丽. 儿童非典型病原体的实验室诊断 [J]. 临床儿科杂

志, 2009, 27(7): 612-615.

[10] 沈叙庄, 杨永弘. 儿童社区获得性肺炎病原学研究现状 [J]. 中国实用儿科杂志, 2003, 18(9): 513-516.

[11] 贾建江. 探讨社区获得性肺炎的临床特点及治疗措施 [J]. 中外医学研究, 2013, 11(5): 127.

[12] 李建, 戈艳蕾, 李繁丽, 等. 社区获得性肺炎住院患者病原体构成分析 [J]. 临床肺科杂志, 2013, 18(2): 338.

(收稿日期: 2013-05-08)