

· 调查报告 ·

成都地区人乳头瘤病毒感染亚型、年龄分布、多重感染及相关趋势研究

聂双双¹, 丁显平^{1,2,△}, 陈祖翼¹, 魏霞^{1,2}, 张辉¹

(1. 特色生物资源研究与利用川渝共建实验室/四川大学生命科学学院遗传医学研究所, 四川成都 610041; 2. 重庆南川生物技术研究院, 重庆 408400)

摘要:目的 了解四川成都地区 23 种 HPV 的亚型分布、多重和混合感染比例以及年龄比例, 并分析历年变化趋势。方法 应用反向点杂交技术对 9 399 例患者标本进行 HPV 检测, 对所得数据进行统计分析。结果 共检测出阳性标本 3 472 例, 感染率 36.94%; 其中高危型单一感染 1 594 例, 感染率为 16.96%; 低危型单一感染 1 033 例, 感染率为 10.99%; 5 年内 HPV-58、33 感染率有所上升; 多重感染以双重感染为主; 混合感染中高危型-低危型混合感染最为常见, 感染率在 5 年内有所上升; >20~30 岁年龄段具有较高的感染率。结论 该地区高危型 HPV 的感染以 16 型为首, 低危型感染以 6 型为首, 多重感染占有较大比例。

关键词: HPV 亚型; 多重感染; 混合感染; 年龄

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2013.22.039

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2013)22-3026-03

The distribution of HPV subtype, the multiple infection and age study during 5 years in Chengdu, ChinaNie Shuangshuang¹, Ding Xianping^{1,2,△}, Chen Zuyi¹, Wei Xia^{1,2}, Zhang Hui¹

(1. Bio-resource Research and Utilization joint Key Laboratory of Sichuan and Chongqing/Institute of Medical Genetics, School of Life Science, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 2. Biotechnology Academy of Nanchuan, Chongqing 408400, China)

Abstract: Objective In order to study the distribution of 23 common HPV subtypes in Chengdu, including multiple and mixed infection ratios, age proportion, and variation tendency during 5 years. **Methods** Application of Reverse point hybrid technology was applied to process the HPV detection of 9 399 samples. The results were statistically analyzed by SPSS19.0. **Results** There were 3 472 patients with positive test specimen and the infection rate was 36.94%. There were 1 594 cases infected one type of high-risk HPV, and the infection rate was 16.96%. There were 1 033 cases infected one type of low-risk HPV, and the infection rate was 10.99%. HPV58 and HPV33 infection rates were increase during 5 years. The majority of multiple infection was double infection. The mixed infection of high risk HPV and low-risk HPV was the most frequent, and the infection rate was increasing in five years. People aged from 21 to 30 had high infection rates. **Conclusion** HPV16 was the most popular type of high risk HPV, and HPV6 was the most popular one in low risk HPV. Multiple infection hold a great proportion.

Key words: HPV subtype; multiple infection; mixed infection; age

人乳头瘤病毒(HPV)是定向感染人体皮肤及黏膜复层鳞状上皮的一类乳头瘤病毒, 目前已被鉴定亚型 100 多种, 其中约 40 余种与人类生殖器皮肤黏膜病变相关^[1]。流行病学调查提示 HPV 主要通过性行为传播, 根据其感染后的致癌性与否 HPV 亚型又分为高危型和低危型; 高危型以 HPV-16、18、58 最为常见, 低危型以 HPV-6、11 为主。HPV 亚型在不同人群、不同地区分布情况不一^[2]; 本文回顾性分析了运用反向点杂交法对 HPV 检测的结果, 以了解本地区 HPV 的感染特征, 为相关研究和临床诊断提供支持。

1 资料与方法

1.1 标本来源 2007~2011 年采集临床标本共 9 399 例, 主要通过成都地区部分医院、医师合作协议采集(成都妇女儿童、安琪儿、维多利亚女子、金沙、生殖专科、阳光、天府、锦江妇幼、丽人、棕南等医院)。

1.2 仪器与试剂 PCR 扩增仪(杭州朗基有限公司), FYY-3 型分子杂交仪(兴化市分析仪器厂), HPV DNA 分型基因芯片检测系统(亚能生物技术有限公司), 常用试剂(国产分析纯)。

1.3 方法

1.3.1 HPV DNA 提取及 PCR 扩增 按 HPV 基因分型检测试剂盒说明进行 DNA 提取、PCR 扩增及 -20℃ 保留上清待

用。扩增条件如下: 50℃ 15 min; 95℃ 10 min; 94℃ 30 s, 42℃ 90 s, 72℃ 30 s, 40 个循环; 72℃ 5 min。PCR 反应体系为: ddH₂O 14.2 μL, 反应缓冲液(含 MgCl₂) 2.5 μL, dNTP 2 μL, 上下游引物各 0.5 μL, 样品 DNA 5 μL, Taq 酶 0.3 μL, 反应总体积 25 μL。

1.3.2 杂交和显色 取 15 mL 塑料离心管, 标明编号, 分别放入标有同样编号的膜条, 加入 A 液 5 mL (2×SSC, 0.1% SDS, pH 7.4) 及所有 PCR 产物。按 HPV 基因分型检测试剂盒说明进行杂交显色, 显色结果亦按说明书进行判定, 每组实验均设阴性和阳性对照。

1.4 统计学处理 数据采用 SPSS19.0 统计软件进行分析, 检测结果用 χ^2 检验分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 单重感染亚型检测结果 在送检的 9 399 例标本中, 除 HPV-MM4 未检测出来外, 其他各型均有检出, 共检出阳性标本 3 472 例, 总检出率 36.94%; 其中单一型感染 2 627 例, 多重型感染 845 例。单一型感染中, 高危型感染 HPV-16 最多, 占总检出率的 8.68%, 高危型检出率的 51.19%; 其次为 HPV-18, 占总检出率的 1.78%, 高危型检出率的 10.48%; 低危型感染 HPV-6 为首, 占总检出率的 5.14%, 低危型检出率

的 46.76%。高危型检出率是低危型检出率的 1.54 倍,见表 1。

表 1 HPV 单重感染型别分布

HPV 亚型	检出数 (n)	总检出率 (%)	高危型/低危型 检出率 (%)
高危型	1 594	16.96	100.00
16	816	8.68	51.19
18	167	1.78	10.48
58	148	1.57	9.28
33	121	1.29	7.59
56	67	0.71	4.20
59	55	0.59	3.45
52	49	0.52	3.07
31	40	0.43	2.51
66	34	0.36	2.13
68	26	0.28	1.63
73	18	0.19	1.13
51	16	0.17	1.00
35	12	0.13	0.75
53	10	0.11	0.63
39	6	0.06	0.38
45	6	0.06	0.38
83	3	0.03	0.19
MM4	0	0.00	0.00
低危型	1 033	10.99	100.00
6	483	5.14	46.76
11	393	4.18	38.04
43	125	1.33	12.10
42	27	0.29	2.61
44	5	0.05	0.48

2.2 多重感染检测结果 在多重感染的 845 例标本中,2 种亚型的双重感染最为常见,占总检出率的 6.22%,占多重感染的 69.23%,组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 14.791, P < 0.05$)。高危型和低危型混合感染共 433 例最为常见,占混合感染的 51.24%;纯高危型混合感染 298 例,占混合感染的 35.27%;纯低危型混合感染 114 例,占总感染的 13.49%,组间差异比较具有统计学意义($\chi^2 = 21.566, P < 0.05$),见表 2。

2.3 不同年龄段 HP 亚型感染检测结果 本研究将感染者分为 4 个年龄组:≤20 岁、>20~30 岁、>30~40 岁、>40 岁。其 HPV 的感染率依次为 14.39%、44.02%、25.30%、16.28%,成都地区 HPV 感染的主要年龄阶段为 21~30 岁之间,组间比较差异有统计学意义($\chi^2 = 22.0145, P < 0.05$),见表 3。

表 2 HPV 混合感染统计

多重感染类型	标本数(n)	总检出率 (%)	混合感染检出率 (%)
双重感染	585	6.22	69.23
多重感染	260	2.77	30.77
HR-HR*	298	3.17	35.27
HR-LR#	433	4.61	51.24
LR-LR [△]	114	1.21	13.49

*: 高危型混合感染; #: 高危型与低危型混合感染; [△]: 低危型混合感染。

2.4 不同年份单重感染型别检测结果 本研究将感染者的

HPV 亚型分为 2007、2008、2009、2010 及 2011 年 4 个时间段进行统计分析,高危型 HPV 感染率中 HPV-16 均居绝对首位,但感染率有下降的趋势;HPV-58 感染率在 2007、2010、2011 年 3 年内均高于 HPV-18 排第 2 位,HPV-33 感染率逐年具有上升趋势,值得重视;低危型 HPV 感染率中各亚型变化不大,从高到低依次为:HPV-6、11、43、42、44,见表 4。

2.5 不同年份混合感染及各年龄段 HP 亚型感染检测结果 在 2007、2008、2009、2010 及 2011 年 4 个时间段中,双重感染与三重以上感染的比例变化不大;混合型感染中,高危型和低危型混合感染的比例有所上升,见图 1(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”);除 2008 年外,其他各年份感染的年龄分布变化不大,主要感染年龄均在大于 20~30 岁之间,见图 2(见《国际检验医学杂志》网站“论文附件”)。

表 3 HPV 感染年龄分布

年龄(岁)	阳性数(n=2 751)	HPV 感染率 (%)
≤20	396	14.39
>20~30	1 211	44.02
>30~40	696	25.30
>40	448	16.28
合计	2 751	100.00

3 讨 论

宫颈癌是一种在世界各地均较常见的妇女疾病,在女性中排名第 2 的常见恶性肿瘤,发病率高达 187/1 000 000^[3-4],其中超过 85% 的感染者存在于发展中国家。有强烈的流行病学证据表明 HPV 在宫颈癌的病因中扮演着重要的角色。HPV DNA 检测呈阳性的妇女患宫颈癌的风险高于 HPV DNA 检测呈阴性的妇女 50 倍^[5-6]。尽管 HPV 感染在年轻女性中非常常见,但只有为数不多的病例会持续发展成宫颈癌。持续性 HPV 亚型的感染是引起宫颈癌的重要原因。

近些年来,流行病学调查研究表明,在全世界范围内有 2%~20% 甚至更多的妇女在子宫颈处能够检测到 HPV DNA^[6]。相关研究表明,吸烟习惯、性伴侣数量、性传播疾病历史和宫颈细胞学异常与人乳头瘤病毒易感性有关^[7]。罗慧琴等研究显示的 HPV 亚型感染率为 41.73%^[8],本研究结果显示 HPV 亚型感染率为 36.94%,支持其结果。

相关研究表明,HPV 亚型分布存在地域性差异,不同亚型 HPV 感染致癌性及其后果也不同^[9]。Smith 等^[10]根据 14 595 名宫颈浸润癌患者和 7 094 名宫颈癌前病变患者做了一个荟萃分析,报道了 HPV-16、18、31、33、35、45、52、58 是检测出较多的亚型。本研究 HPV 分型研究显示,成都地区普通患者 HPV 高危亚型检出率从高到低依次为 HPV-16、18、58、33、56、59、52、31、66、68,不同年份亚型检出率略有差异,HPV-58、33 检出率均有上升趋势。结果与其他地方有区别的原因可能在于:HPV 亚型分布的地域性差异;HPV 亚型感染致癌性的不同,同时数据不够充分和统计分析差异也有一定影响。低危型感染中 HPV-6、11 占有主导地位,与前人研究结果相同,不同年份差异不大。

不少学者认为 HPV 的多重感染并不少见,Bachtiary 等^[11]研究显示 HPV 多重感染的比例为 43.9%,本研究显示多重感染比例为 8.99%,低于 Bachtiary 等^[11]的结果,检出率的差异不仅与研究人群、检测方法相关,还与数据统计分析差

异有关。在本研究中,多重感染中双重感染居主要地位,不同年份变化不大,但高危型和低危型混合感染的比例逐年有所上升。

绝大多数女性一生至少感染了一种 HPV,但不同女性感染 HPV 的年龄有所差异,据 de Sanjose 等^[12]的研究显示: HPV 感染高峰在 34 岁之前,35~44 岁的 HPV 感染率随之降低,而对于大于 45 岁组,除亚洲外其他地区的感染率又有所增加。本研究显示:>20~30 岁为 HPV 感染主要年龄阶段,>40 岁的感染率没有增加,并且各年份差异不大,基本支持前人研究结果。

参考文献

[1] Steben M, Duarte-Franco E. Human papillomavirus infection; Epidemiology and pathophysiology[J]. *Gynecol Oncol*, 2007, 107(2 Suppl 1):S2-5.

[2] Clifford GM, Gallus S, Herrero R, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: A pooled analysis[J]. *Lancet*, 2005, 366(9490):991-998.

[3] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide[J]. *J Pathol*, 1999, 189(1):12-19.

[4] Bosch FX, de Sanjose S. Human papillomavirus and cervical cancer-burden and assessment of causality[J]. *JNCI Monographs*, 2003(31):3-13.

[5] Bosch FX, Lorincz A, Muoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. *J Clin Pathol*, 2002,

55(4):244-265.

[6] Bosch FX, Manos MM, Muoz 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.

[7] Kasap B, Yetimlar H, Keklik A, et al. Prevalence and risk factors for human papillomavirus DNA in cervical cytology[J]. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 2011, 159(1):168-171.

[8] 罗慧琴, 王志刚, 李玲, 等. 太原地区 HPV 感染基因型分布与不同年龄段的相关性研究[J]. *国际检验医学杂志*, 2012, 33(21):2602-2605.

[9] Clifford GM, Smith JS, Plummer M, et al. Human papillomavirus types in invasive cervical cancer worldwide: a meta-analysis[J]. *Br J Cancer*, 2003, 88(1):63-73.

[10] Smith JS, Lindsay L, Hoots B, et al. Human papillomavirus type distribution in invasive cervical cancer and high-grade cervical lesions: a meta-analysis update[J]. *Int J Cancer*, 2007, 121(3):621-632.

[11] Bachtiairy B, Obermair A, Dreier B, et al. Impact of multiple HPV infection on response to treatment and survival in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer[J]. *Int J Cancer*, 2002, 102(3):237-243.

[12] de Sanjose 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.

(收稿日期:2013-05-08)

(上接第 3025 页)

PCR 核酸检测具有较好的一致性,这可能与重症 HFMD 患儿病程较长,抗体产生时间充裕有关。在临床明确诊断但 PCR 核酸检测全阴的重症 HFMD 病例中,有 10 例 EV71 IgM 阳性和 2 例 CA16 IgM 阳性病例,这可能与临床用药干扰病毒复制周期造成 PCR 扩增反应抑制有关^[9]。同时也有 17 例 EV71 核酸阳性和 3 例 CA16 核酸阳性但 IgM 抗体阴性病例,可能与抗体产生的个体差异性有关或与试剂的反应性相关。因此有条件的实验室可以联合 IgM 抗体和 PCR 核酸检测,将更有助于重症 HFMD 的早期诊断。值得注意的是,本研究中有 40 例 EV71、CA16 及 EVU 检测全阴重症 HFMD 病例,分析原因有以下可能:其他类型肠道病毒感染;病毒变异;感染早期的假阴性。确切原因值得进一步研究。

本研究结果显示,211 重症 HFMD 患儿中男性达 63.0%,男女发病比例为 1.78:1,其中又以 1~2 岁男性患儿比例最高,达 31.8%。重症 HFMD 的好发季节为春夏季节,5 月份普通重症、危重症及死亡 HFMD 病例均达全年最高峰,这些流行病学特点与其他报道相同或相似^[8-9]。

综上所述,2012 年江西地区重症 HFMD 主要病原体为 EV71,2 岁以下男性儿童为重症 HFMD 的高危人群。EV71、CA16 IgM 抗体检测具有良好的灵敏度和特异性,在重症 HFMD 诊断中具有重要意义。PCR 核酸联合 EV71、CA16 IgM 抗体检测,更有助于重症 HFMD 的早期诊断。

参考文献

[1] Tu PV, Thao NT, Perera D, et al. Epidemiologic and virologic in-

vestigation of hand, foot, and mouth disease[J]. *Emerg Infect Dis*, 2007, 13(11):1733-1741.

[2] 杜曾庆, 吴茜, 王美芬, 等. 重症手足口病 135 例临床治疗及分析[J]. *中华临床医师杂志:电子版*, 2010, 4(6):15.

[3] 曾枚, 王建设. 重视手足口病的病原学及临床研究[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(4):193-194.

[4] Liu MY, Liu W, Luo J, et al. Characterization of an outbreak of hand, foot, and mouth disease in nanchang, China in 2010[J]. *PLoS One*, 2011, 6(9):e25287.

[5] Chang LY, Huang LM, Gau SS, et al. Neurodevelopment and cognition in children after enterovirus 71 infection[J]. *N Engl Med*, 2007, 356(12):1226-1234.

[6] 张颖, 盖中涛. 手足口病研究进展[J]. *山东医药*, 2008, 48(17):113-114.

[7] Yu N, Guo M, He SJ, et al. Evaluation of human enterovirus 71 and coxsackievirus A16 specific immunoglobulin M antibodies for diagnosis of hand foot and mouth disease[J]. *Virology*, 2012, 9:12.

[8] 杨晓红, 吴茜, 温柏平, 等. 2010 年昆明地区儿童手足口病的流行特征[J]. *中国当代儿科杂志*, 2012, 14(3):192-194.

[9] 葛艳玲, 夏爱梅, 姚玮蕾, 等. 2010 年至 2011 年上海地区儿童手足口病肠道病毒 71 感染的流行病学[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(4):200-203.

(收稿日期:2013-06-12)