

• 临床检验研究论著 •

人乳头瘤病毒分型检测在宫颈疾病筛查中的应用

钟芳芳¹, 沈丽娟¹, 倪勇²

(1. 安徽省芜湖中医院病理科, 安徽芜湖 241000; 2. 安徽省芜湖市中医院检验科, 安徽芜湖 241000)

摘要:目的 探讨人乳头瘤病毒(HPV)型别检测在宫颈疾病筛查中的意义。方法 选取该院 687 例妇科就诊患者, 对其进行 HPV-DNA 基因分型检测荧光实时定量 PCR(FQ-PCR)检测; 选取同期于该院进行妇科体检的 389 例健康体检妇女, 对其进行 HPV-DNA 定量检测(FQ-PCR), 检测结果大于 5.0×10^2 IU/mL 者再进行 HPV-DNA 基因分型检测。结果 687 例患者中, HPV 阳性者共 164 例, 占 23.9%; 其中, 单一感染者占 74.3%, 复合型别感染者占 25.6%; 复合型别感染中可见二重至四重感染, 其中以二重感染最为多见。常见的型别为 HPV16、52、58、35 高危型。389 例健康体检妇女中 HPV 阳性者共 29 例, 占 7.5%; 其中单一感染占 79.3%, 复合型别感染者占 20.7%, 复合型别感染中可见二至三重感染, 其中以二重感染最为多见。常见的型别为 HPV52、58、16、18 高危型。结论 HPV 感染是引起宫颈癌的主要原因, 进行 HPV 检测和分型有助于宫颈癌的筛查和预防。

关键词: 宫颈癌; 早期诊断; 人乳头瘤病毒

DOI: 10.3969/j.issn.1673-4130.2014.17.023

文献标识码: A

文章编号: 1673-4130(2014)17-2321-03

The application of HPV detection and typing in the screening for cervical disease

Zhong Fangfang¹, Shen Lijuan¹, Ni Yong²

(1. Department of Pathology, The Traditional Chinese Medicine Hospital of Wuhu, Wuhu, Anhui 241000, China;

2. Department of Clinical Laboratory, the Traditional Chinese Medicine Hospital of Wuhu, Wuhu, Anhui 241000, China)

Abstract: Objective To investigate the significance of Human papilloma virus(HPV) typing in the screening of cervical disease. **Methods** 687 cases of gynecological patients in the hospital were enrolled in the study, whose HPV-DNA genotype was detected by real-time fluorescence quantitative PCR(FQ-PCR). In addition to that, 389 healthy women who took gynecological examination in the hospital in the same period were enrolled in the study, HPV-DNA quantitative detection were performed on those people (FQ-PCR were used) firstly, and the persons with more than 5×10^2 IU/mL HPV-DNA were tested for the HPV-DNA subtype. **Results** In the 687 cases of gynecological patients, 164 cases were HPV positive which accounted for 23.9%; The single-infection patients accounted for 74.3%, mixed infection accounted for 25.6%. The mixed infection included 2-4 types of infection, among which the double infection was most common. The common type were HPV16, 52, 58 and 35. In 389 cases of healthy women, 29 cases were found HPV positive, which accounted for 7.5%; The single infection accounted for 79.3%, mixed infection accounted for 20.7%, mixed infection included 2-3 types of HPV infection, in which double infection is the most common situation. The common type were HPV52, 58, 16 and 18. **Conclusion** HPV infection is the major cause of cervical cancer, HPV detection and typing contribute to cervical cancer screening and its prevention.

Key words: cervical cancer; early diagnosis; human papilloma virus

宫颈癌是指发生在宫颈阴道部或移行带的鳞状上皮细胞与宫颈管内膜的柱状上皮细胞交界处的恶性肿瘤, 是发病率仅次于乳腺癌的妇科肿瘤。每年约有 51 万妇女被诊断为宫颈癌, 其中约 28.8 万妇女死亡。我国每年新增宫颈癌患者 13.5 万, 占全球新发病数量的 1/3, 约 8 万人死亡^[1]。人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈上皮内瘤变和浸润性宫颈癌发生的重要原因。99.7% 的患者宫颈癌可以检出 HPV。高危型 HPV 持续感染是导致宫颈癌发生、发展的重要原因^[2]。本研究探讨了 HPV 检测和分型在宫颈癌筛查和预防中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2013 年 1~12 月在芜湖市中医院妇科门诊就诊的 687 例患者及 389 例于妇科进行健康体检的妇女。入选标准: 年龄 19~70 岁, 有性生活史; 不在妊娠期、哺乳期或月经期; 无阴道镜宫颈活检史; 无子宫切除病史和宫颈手术治疗史; 无女性生殖系统恶性肿瘤疾病史。

1.2 仪器与试剂 主要仪器为 ABI-7500 荧光定量 PCR 仪(美国 PE 公司); HPV 分型检测试剂盒: 采用上海之江生物科

技股份有限公司的高危型 HPV 分型核酸测定试剂盒, 检测型别包括 HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68 共 13 种 HPV; HPV 定量检测试剂盒: 采用中山大学达安基因股份有限公司的高危型 HPV 核酸定量检测试剂盒, 检测型别包括 HPV16、18、31、33、45、52、56、58 共 8 种高危型 HPV。

1.3 方法

1.3.1 标本采集 无菌干棉球轻轻擦去宫颈表面的分泌物, 专用的检查毛刷于宫颈鳞状上皮与柱状上皮交接部常规刷取细胞, 洗入装有细胞保存液小瓶中保存。

1.3.2 HPV 检测方法的选取 (1) 对就诊患者进行 HPV 分型检测: 采用上海之江生物科技股份有限公司的高危型 HPV 分型核酸测定试剂盒。(2) 对健康体检妇女进行 HPV 定量检测: 采用中山大学达安基因股份有限公司高危型 HPV 核酸定量检测试剂盒(检测结果大于 5.0×10^2 IU/mL 者再进行 HPV-DNA 基因分型检测[PCR 法, 同(1)]。

1.3.3 HPV 分型检测 HPV-DNA 提取、试剂配制、加样严格按照试剂盒说明书进行。PCR 扩增: 反应管置于 ABI-7500

定量荧光 PCR 仪上,按试剂盒推荐的循环参数进行设置,单点荧光检测在 62 ℃,反应体系为 40 μL。荧光检测通道选择:选用 FAM 和 VIC 通道。基线和阈值设定:基线调整取 6~15 个循环的荧光信号,阈值设定原则以阈值线刚好超过 H₂O 检测荧光曲线的最高点。质量控制:H₂O 检测结果应为仪器 FAM、VIC 通道循环阈值(Ct)栏均显示“UNDET”,阳性对照品检测结果应为:Ct≤35,否则实验视为无效。

1.3.4 HPV 分型检测结果的判断 如果待检样本 Ct 在 38~40 之间,需重复测定,如仍在 38~40 之间,且扩增曲线呈典型的 S 型,则判断为阳性;若非典型 S 型曲线,则判为阴性。Ct≤38 且扩增曲线呈典型 S 型的结果判断见表 1。分情况处理:(1)当待检样本 HPV(31 型+IC)核酸荧光 PCR 检测混合液的 VIC 通道 Ct>32 且在其他混合液中均为阴性,则无法判断结果,说明提取存在问题或者 PCR 检测存在问题,需重复试验;(2)当待检样本 HPV(31 型+IC)核酸荧光 PCR 检测混合液的 VIC 通道 Ct≤32 且在其他混合液中均为阴性,则该样本判定为阴性。

表 1 不同 HPV 核酸荧光检测混合液进行检测的结果判断方法

HPV 核酸荧光检测混合液	FAM 通道 Ct≤38 且扩增曲线呈典型 S 型的结果判断	VIC 通道 Ct≤38 且扩增曲线呈典型 S 型的结果判断
16、56 型	HPV16 型	HPV56 型
18、45 型	HPV18 型	HPV45 型
35、39 型	HPV35 型	HPV39 型
39、51 型	HPV39 型	HPV51 型
58、52 型	HPV58 型	HPV52 型
31 型、IC	HPV31 型	需分情况处理
33 型	HPV33 型	—
68 型	HPV68 型	—

—:无数据。

1.3.5 HPV 核酸定量检测 严格按照试剂盒说明书进行操作、质量控制和结果判断。

1.4 统计学处理 采用 SPSS17.0 软件对数据进行统计分析。计数资料采用率表示,分析方法为一般频数分布。

2 结 果

2.1 妇科门诊就诊患者 HPV 分型检测 687 例患者平均 37.4 岁,HPV 阳性者共 164 例,占 23.9%(164/687)。其中,单一感染 122 例,占 74.3%(122/164),复合型别感染 42 例,占 25.6%(42/122),复合型别感染中可见二重至四重感染,其中以二重感染最为多见。常见的型别为 HPV16、52、58、35 高危型。

2.2 健康体检妇女的 HPV 定量检测 受检的 389 例健康体检妇女平均 40 岁,HPV 阳性者共 29 例,占 7.5%(29/389)。其中,单一感染 23 例,占 79.3%(23/29),复合型别感染 6 例,占 20.7%(6/29),复合型别感染中可见二重至三重感染,其中二重感染 5 例。常见的型别为 HPV52、58、16、18 高危型,与高危型 HPV 感染在普通人群中的感染率(8%)相近。见表 2~4。

表 2 HPV 感染的检出率(%)

患者类型	HPV 感染率	单一感染	多重感染	常见的型别
妇科患者	23.9	74.3	25.6	HPV16、52、58、35
妇科体检者	7.5	79.3	20.7	HPV52、58、16、18

表 3 妇科患者 HPV 亚型单一感染检出例数排前十位亚型的分布情况[n(%)]

HPV 亚型	妇科患者检出情况
16	23(18.9)
52	22(18.0)
58	18(14.8)
35	17(18.9)
56	12(18.9)
59	8(18.9)
51	7(18.9)
18	5(18.9)
33	5(18.9)
31	2(18.9)
单一感染	122(74.3)

表 4 妇科体检者 HPV 亚型单一感染检出例数排前十位亚型的分布情况[n(%)]

亚型	妇科体检者检出情况
52	6(26.1)
58	4(17.4)
16	3(13.0)
18	3(13.0)
59	2(8.7)
56	1(4.0)
51	1(4.0)
35	1(4.0)
68	1(4.0)
39	1(4.0)
单一感染	23(79.3)

3 讨 论

HPV 是属于乳头多瘤空泡病毒科乳头瘤属的一类特异感染人皮肤和黏膜的双链闭合环状 DNA 病毒。DNA 序列分析发现 HPV 至少有 200 多个基因型。迄今已确定基因组全序列的 HPV 基因型有 85 种,已证明其中 30 种 HPV 基因型与包括子宫颈在内的生殖系统的疾病相关,20 余种已证实与子宫颈肿瘤相关。高危型 HPV 感染是子宫颈癌和子宫颈上皮瘤变高发的主要危险因素。本研究的结果与文献报道西安市长安区妇女高危型 HPV 感染率 23.56% 相近^[3],高于西藏地区 9.19%^[4]和呼和浩特地区 13.04%^[5]的感染率,低于绍兴地区 54.75%^[6]及北京地区 57.1%^[7]的感染率。

浸润性子宫颈癌(ICC)是严重威胁妇女健康的主要恶性肿瘤之一,发病率居女性生殖道恶性肿瘤之首,病死率在所有女性恶性肿瘤中居第 2 位,仅次于乳腺癌^[8]。宫颈癌存在一系列的癌前病变,其发生、发展是一个由宫颈上皮内瘤变逐渐发展为癌的长期、连续、可逆的病理过程,而且是一种相对漫长及可逆转的发展过程,在这一过程的任一阶段早期发现、及时诊治,都可以阻断其向浸润性子宫颈癌发展。据美国癌症学会(ACS)统计,2002 年宫颈癌的 5 年生存率在发达国家为 61%,而发展中国家为 41%,早期宫颈癌手术治疗患者 5 年生存率达 80%~90%^[9]。因此,对宫颈癌癌前病变和早期癌的及时高效筛查是预防和治疗宫颈癌、改善患者(下转第 2325 页)

外周血显著增多。Liu 等^[14]对 168 例胸腔积液患者进行前瞻性研究,发现胸腔积液 T-SPOT. TB 检测与外周血 T-SPOT. TB 检测的灵敏度相似,但特异性明显提高,其检测特异度分别为 94.5% 和 76.1%。Zhang 等^[15]对 167 例胸腔积液患者同时进行胸腔积液和外周血 T-SPOT. TB 检测,发现胸腔积液 T-SPOT. TB 的灵敏度与特异度明显高于外周血,且斑点数为外周血的 4.6 倍,说明胸腔积液检测 T-SPOT. TB 对诊断活动性结核疾病意义更大,更能准确诊断结核感染。

综上所述,外周血 T-SPOT. TB 联合胸腔积液 ADA 检测对诊断结核性胸膜炎具有较高的灵敏度,对疑似为结核性胸膜炎的患者进行快速而准确的诊断具有重要的辅助诊断价值,但是改用胸腔积液单个核细胞 T-SPOT. TB 检测可能比使用外周血进行检测有更好的特异度。

参考文献

[1] 王黎霞,成诗明,陈明亭,等. 2010 年全国第五次结核病流行病学抽样调查报告[J]. 中国防痨通讯,2012,34(8):485-508.
 [2] 卜建玲,马玛. 结核性胸膜炎的诊断现状与研究进展[J]. 中国防痨杂志,2009,31(1):33-36.
 [3] Pai M, Zwerling A, Menzies D. Systematic review: T-cell-based assays for the diagnosis of latent tuberculosis infection: an update [J]. Ann Intern Med,2008,149(3): 177-184.
 [4] Lee SS,Chou KJ,Su JJ,et al. High prevalence of latent tuberculosis infection in patients in end-stage renal disease on hemodialysis: Comparison of QuantiFERON-TB GOLD,ELISPOT,and tuberculin skin test[J]. Infection,2009,37(2):96-102.
 [5] Lalvani A,Pareek M. Interferon gamma release assays: principles and practice[J]. Enferm Infecc Microbiol Clin,2010,28(4):245-252.
 [6] Khow-Ean N,Booraphun S,Aekphachaisawat N,et al. Adenosine

deaminase activity level as a tool for diagnosing tuberculous pleural effusion[J]. Southeast Asian J Trop Med Public Health,2013,44(4): 655-659.
 [7] Fritsch RD,Shen X,Sims GP,et al. Stepwise differentiation of CD4 memory T cells defined by expression of CCR7 and CD27 [J]. J Immunol,2005,175(10): 6489-6497.
 [8] Beverley PC. Primer: making sense of T-cell memory[J]. Nat Clin Pract Rheumatol,2008,4(1): 43-49.
 [9] Seder RA,Darrah PA,Roederer M. T-cell quality in memory and protection: implications for vaccine design[J]. Nat Rev Immunol, 2008,8(4): 247-258.
 [10] 张丽帆,刘晓清. γ 干扰素释放分析 T-SPOT. TB 诊断结核感染临床应用进展[J]. 中国医学科学院学报,2009,31(4):506-510.
 [11] 郑春燕,李海,杨莉,等. 酶联免疫斑点技术在快速诊断结核性胸膜炎中的应用[J]. 广东医学,2013,34(16):2503-2506.
 [12] 罗虎,宫亮,周向东. 胸腔积液 ADA 值在结核性胸膜炎中的诊断价值及临界值探讨[J]. 重庆医学,2012,41(35):3718-3719.
 [13] Tay TR,Tee A. Factors affecting pleural fluid adenosine deaminase level and the implication on the diagnosis of tuberculous pleural effusion: a retrospective cohort study [J]. BMC Infect Dis,2013,13(1):546.
 [14] Liu F,Gao M,Zhang X,et al. Interferon-gamma release assay performance of pleural fluid and peripheral blood in pleural tuberculosis[J]. PLoS One,2013,8(12):e83857.
 [15] Zhang L,Zhang Y,Shi X,et al. Utility of T-cell interferon- γ release assays for diagnosing tuberculous serositis: a prospective study in Beijing, China[J]. PLoS One,2014,9(1):e85030.

(收稿日期:2014-05-08)

(上接第 2322 页)

预后提高生存质量的关键。大量流行病学及分子生物学研究已经证明,HPV 感染是宫颈癌及宫颈上皮肉瘤样病变的主要病因。不同型别 HPV 的致病性不同,以高危型 HPV 持续感染最为严重,因此,HPV 检测及分型对宫颈癌的筛查,早期诊断、防治和预后判断等均具有重要的临床价值。

目前国内大多数三甲医院已经开展 HPV 分子检测作为常规筛查宫颈病变的手段,HPV 检测筛查宫颈癌是一种经济而又相对高效的筛查方案,而且其特异度较高,误诊率较低。研究提示,HPV 感染率随宫颈病变程度的加重而明显升高,在宫颈癌组中 HPV 感染率极高^[10]。HPV 感染多发生在性活跃期,大部分妇女都是短暂性的 HPV 感染,通常在 8~15 个月消失,只有少数高病毒载量长期持续感染者才会导致宫颈癌前病变及宫颈癌的发生。有研究表明,HPV 感染型别、宿主免疫状态、HPV 持续感染与宫颈癌密切相关^[11]。一次 HPV 筛查阳性并不意味宫颈已处于癌前病变阶段。明确 HPV 感染的型别,对 HPV 感染的治疗、宫颈癌的预防、流行病学调查及其基因疫苗的研制均有重要意义。

参考文献

[1] 崔英,胥爱辉,蔡永娥,等. 人乳头瘤病毒(HPV)致宫颈癌的分子机制研究[J]. 现代肿瘤医学,2008,16(1):143-145.
 [2] Nomellini RS,Barcelos AC,Michelin MA,et al. Utilization of human papillomavirus testing for cervical Cancer prevention in a university hospital[J]. Cad Saude Publica,2007,23(6): 1309-1318.

[3] 单玉珍,马向东,刘明晖,等. 西安市长安区妇科就诊妇女高危型 HPV 感染及亚型分布调查研究[J]. 中国现代医药杂志,2012,14(4):38-41.
 [4] 靳琼,沈铿,李辉,等. 西藏自治区妇女子宫颈乳头状瘤病毒感染现状调查及相关因素分析[J]. 中华妇产科杂志,2009,44(12): 898-902.
 [5] 张健,孟和宝力高,赵文双,等. 呼和浩特地区宫颈疾病患者人乳头状瘤病毒-DNA 分型检测分析[J]. 华北国防医药,2010,44(2): 124-125.
 [6] 陶萍萍,张国荣,卞美璐,等. 妇科门诊 21 种人乳头状瘤病毒感染状况分析[J]. 中日友好医院学报,2008,22(4):208-211.
 [7] 杨英捷,赵健,李雪倩,等. 2285 例女性下生殖道人乳头状瘤病毒感染筛查结果分析[J]. 中国实用妇科与产科杂志,2006,22(6): 444-445.
 [8] Valdespino VM,Valdespino VE. Cervical Cancer screening: state of the art[J]. Curr Opin Obstet Gynecol,2006,18(1): 35-40.
 [9] Parkin DM,Bray F,Ferlay J,et al. Global cancer statistics,2002 [J]. CA Cancer J Clin,2005,55(2): 74-108.
 [10] Bello BD,Spinillo A,Alberizzi P,et al. Cervical infections by multiple human papillomavirus (HPV) genotypes:prevalence and impact on the risk of precancerous epithelial lesions[J]. J Med Virol,2009,81(4): 703-712.
 [11] Flores R,Papenfuss M,Klimecki WT,et al. Cross-sectional analysis of oncogenic HPV viral load and cervical intraepithelial neoplasia[J]. Int J Cancer,2006,118(5):1187-1193.

(收稿日期:2014-06-01)