

流式荧光杂交法检测人乳头瘤病毒的临床应用

陈昭华, 赵 星, 徐红星(南京医科大学附属苏州市立医院本部检验科, 江苏苏州 215002)

【摘要】 目的 探讨流式荧光杂交法检测人乳头瘤病毒(HPV)的临床应用价值。**方法** 采集苏州地区 1 406 例妇科就诊患者宫颈脱落细胞, 用流式荧光杂交技术检测 HPV 基因型, 并对 HPV 感染率、基因亚型和年龄分布等进行分析。**结果** 检出 HPV 感染 576 例(40.97%), 其中单一亚型感染 392 例(27.88%), 多重亚型感染 184 例(13.09%); 采用流式荧光杂交法可同时检测 26 种 HPV 基因亚型, 最常见的亚型为 HPV-6、11、16、52、58 等; 单纯 HPV 低危亚型感染 117 例, 占阳性病例的 20.31%, 高危亚型感染 365 例(63.37%); 50~59 岁年龄组 HPV 感染率最高(52.24%), 30~39 岁年龄组感染率最低(34.02%); 并且, 随着年龄增加低危亚型感染率逐步降低, 高危亚型感染率却呈明显上升趋势。**结论** 本地区妇科患者中 HPV 感染率较高, 流式荧光杂交法是检测 HPV 感染的有效方法, 开展 HPV 分型检测对宫颈病变的防治意义重大。

【关键词】 人乳头瘤病毒; 流式荧光杂交; 基因型

DOI: 10.3969/j.issn.1672-9455.2013.06.021 文献标志码: A 文章编号: 1672-9455(2013)06-0685-02

Clinical application of flowcytometry fluorescence hybridization method in human papillomavirus genotype detection

CHEN Zhao-hua, ZHAO Xing, XU Hong-xing (Department of Clinical Laboratory, Suzhou Municipal Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Suzhou, Jiangsu 215002, China)

【Abstract】 Objective To discuss the clinical application of flowcytometry fluorescence hybridization method in human papillomavirus genotype detection. **Methods** The cervical cast off cells of 1 406 patients in Suzhou area were collected, and the HPV genotypes of the samples were analyzed with flowcytometry fluorescence hybridization method. The HPV infection rate, infectious status of various genotypes and age distribution of HPV were analyzed as well. **Results** 576 cases were positive(40.97%), in which single genotype infection rate was 27.88%(392/576), and multiple genotypes infection rate was 13.09%(184/576). The 26 genotypes of HPV could be tested simultaneously with flowcytometry fluorescence hybridization method, and among them the common subtypes were HPV-6, 11, 16, 52, 58, etc. Among all the HPV infected patients, 117 cases(20.31%) were just low risk genotype infection, while high risk HPV infection was in 365 cases(63.37%). The highest HPV infection rate was found at the age group of 50-59 years(52.24%) and the lowest HPV prevalence was found at the age group of 30-39 years(34.02%). Along with the increasing age, the infection rate of high risk HPV was increased gradually and the low risk HPV was decreased. **Conclusion** The positive rate of HPV infection in local area is rather high, flowcytometry fluorescence hybridization method is the most effective method to detect the HPV infection, and it can be of great value to the prevention and treatment of cervical diseases.

【Key words】 human papillomavirus; flowcytometry fluorescence hybridization; genotype

人乳头瘤病毒(HPV)感染是宫颈癌发生的主要危险因素^[1], 99.7%的宫颈癌组织中可检测到 HPV。近年来经分子生物学技术证实 HPV 已有 130 多种基因型^[2], 根据致病性不同可分为低危和高危两大类型。本研究应用流式荧光杂交法检测 HPV 基因型, 对本地区妇科就诊者宫颈 HPV 感染进行了检测和分析, 以探讨其在宫颈病变早期筛查、诊治和预后判断中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 研究对象 选择本院 2011 年妇科就诊的患者 1 406 例, 年龄 20~70 岁, 其中 20~29 岁 466 例, 30~39 岁 485 例, 40~49 岁 375 例, 50~59 岁 67 例, ≥60 岁 13 例, 均因患有不同程度的宫颈疾病就诊。

1.2 取材方法 用无菌棉拭子拭去宫颈分泌物, 再用 HPV 检测专用采样刷伸入宫颈口并紧贴宫颈壁旋转 3 周, 停留约 10 s, 取出采样刷放入专用标本保存液小管中送检。实验室接收标本应充分混匀, 取宫颈脱落细胞悬液 -20 ℃ 保存, 一周内

检测。

1.3 试剂与仪器 流式荧光杂交 HPV 分型试剂盒由上海透景生命科技有限公司生产。可供检测的 HPV 基因亚型共 26 种, 包括 7 种低危亚型 6、11、40、42、44、61、73 及 19 种高危亚型 16、18、26、31、33、35、39、45、51、52、53、55、56、58、59、66、68、82、83。使用仪器为 BIOER Life Pro-96 基因扩增仪、Luminex 200 流式荧光点阵分析仪。

1.4 检测方法

1.4.1 标本处理 取待测宫颈脱落细胞悬液 200 μL 置入 1.5 mL 管中, 13 000 r/min 5 min, 吸弃上清液, 沉淀加 200 μL 核酸提取液振荡混匀, 100 ℃ 裂解 10 min, 13 000 r/min 5 min, 取上清液 5 μL 作为 PCR 反应模板加入 PCR 反应管中置入 PCR 扩增仪。

1.4.2 PCR 反应体系 包括 10 μL 扩增反应液, 5 μL 引物, 0.8 μL Taq 酶, 5 μL 模板。

1.4.3 PCR 扩增参数 95 ℃ 预变性 5 min, 95 ℃ 30 s, 58 ℃

30 s, 68 ℃ 30 s 扩增 5 个循环, 再 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 30 s, 68 ℃ 30 s 扩增 30 个循环。

1.4.4 核酸杂交 取扩增产物 3 μL, 加入 22 μL 微球杂交液, 95 ℃ 5 min, 48 ℃ 30 min, 再加入藻红蛋白标记的链霉亲和素(SA-PE)标记液 48 ℃ 保温 15 min 后放入 Luminex 200 分析仪检测读数。

1.5 结果判读 Luminex200 多功能流式点阵仪读取微球编码及其对应的荧光强弱信号, 经配套分析软件判读检测结果。当阳性内对照 Globin 的信号大于 150, 且大于或等于 2.5 背景信号值时, 任何 HPV 亚型探针信号大于 150, 且大于或等于 2.5 背景信号值即判读为该探针对应的 HPV 亚型阳性。

2 结 果

2.1 HPV 感染概况 1 406 例受检者中共检出 HPV 阳性病例 576 例, 感染率为 40.97%。其中, 单一型别的感染率为 27.88% (392/1 406), 多重型别的感染率为 13.09% (184/1 406)。其中多重型别感染包括双重 (21.18%)、三重 (9.03%)、四重及以上 (1.74%) 型别感染。

2.2 HPV 基因亚型分布 可供检测的 26 种基因亚型都有出现, 但出阳性率明显不同, 各亚型检出情况见表 1。感染率最高的 HPV 病毒亚型依次为 HPV-16、11、6、52、58、33、18 等, 其中低危型以 HPV-6 (89/1 406)、HPV-11 (81/1 406) 亚型感染为主, 高危型以 HPV-16 (118/1 406)、HPV-52 (98/1 406)、

HPV-58 (63/1 406) 亚型为主。

2.3 不同类型 HPV 阳性病例感染情况比较 单一亚型感染者中单一高危亚型感染多见, 占总阳性病例的 49.13%; 多重亚型感染者中不同感染类型分布见表 1。

表 1 单一及多重感染不同类型阳性标本比例

项目	n	占感染总例数比例(%)	占受检总例数比例(%)
单一型感染	392	68.06	27.88
单一低危型	109	18.92	7.75
单一高危型	283	49.13	20.13
多重感染	184	31.94	13.09
多重低危型	8	1.39	0.57
多重高危型	82	14.24	5.83
合计	576	100.0	40.97

2.4 不同年龄段患者 HPV 感染情况 受检者中, 50~59 岁的 HPV 感染率最高, 30~39 岁 HPV 感染率最低。除大于或等于 60 岁年龄组外, 低危亚型感染率随年龄增加呈现下降趋势, 高危亚型感染率则随年龄增加明显上升, 各年龄组 HPV 感染情况见表 2。

表 2 各年龄段患者 HPV 感染情况

年龄(岁)	n	HPV 阳性		低危 HPV 亚型感染			高危型 HPV 亚型感染			高低危混合 HPV 亚型感染		
		n	(%)*	n	(%)**	(%)*	n	(%)**	(%)*	n	(%)**	(%)*
20~29	466	212	45.49	61	28.77	13.09	103	48.58	22.10	48	22.64	10.30
30~39	485	165	34.02	33	20.00	6.80	114	69.09	23.51	18	10.91	3.71
40~49	375	158	42.13	16	10.13	4.27	125	79.11	33.33	17	10.76	4.53
50~59	67	35	52.24	4	11.43	5.97	22	62.86	32.84	9	25.71	13.43
≥60	13	6	46.15	3	50.00	23.08	1	16.67	7.69	2	33.33	15.38
合计	1 406	576	40.97	117	20.31	8.32	365	63.37	25.96	94	16.32	6.69

注: * 表示该年龄段 HPV 感染阳性率; ** 表示占该年龄段 HPV 感染例数的比率。

3 讨 论

宫颈癌是世界范围内仅次于乳腺癌的女性第二大恶性肿瘤, 同时, 也是目前已知为病毒起源的恶性肿瘤之一, 持续的 HPV 感染是宫颈癌发生的必要条件^[2]。宫颈癌的发病及进展要经历一个长期的过程, HPV 感染的筛查及恰当的治疗可以有效阻断癌变。现阶段, 检测 HPV 感染的手段以核酸检测为主。核酸检测的方法大致有第二代基因杂交捕获法(HC-II 法), 传统杂交法, 导流杂交法, 荧光 PCR, 流式荧光杂交法及荧光偏振法等^[3]。本次调查采用的流式荧光杂交法可直接进行 HPV 基因型分析, 其分型技术是基于 Luminex 平台开发的 HPV 分型检测技术, 是一种真正临床应用型生物芯片技术, 灵敏度高, 样本用量少, 可同时检测多个基因亚型, 且使用内标阴性质控和 Globin 人类基因组的一个片段作阳性质控, 可有效监控采样、提取、扩增、杂交等所有环节, 而所得的量化结果, 使结果判读更加客观。

本次调查中, 受检者 HPV 感染率达 40.97%, 这与标本的采集人群有关, 这些受检者均为妇科或宫颈科的患者, 均有不同程度的宫颈疾病, 致使本次试验得到的 HPV 感染率高于体

检普查人群。从 HPV 单一、多重感染构成情况分析发现, HPV 单一亚型感染率高于多重感染率, 合并感染亚型最多达 5 种。说明 HPV 感染以单一型为主, 多重感染和宫颈病变程度是否相关, 尚待结合细胞学方法进一步研究论证。

本文检测的 26 种基因亚型, 包含了临床常见的高危和低危亚型。低危型如 HPV-6、11 型, 常引起外生殖器湿疣、宫颈上皮内低度病变; 高危型如 HPV-16、18、33、35、52 等则与宫颈癌密切相关^[4]。统计发现, 本地区最为常见的低危亚型为 HPV-6、11 型, 高危亚型为 HPV-16、52、58 等, 与文献^[5]报道稍有不同。这是因为 HPV 型别分布有种族和地域差异, 本次结果显示苏州地区 HPV-52、58 高危亚型检出率较高, 具有不同于其他地区的地域特点。

作者将受检者按年龄分组统计, 结果显示 HPV 感染状态与患者年龄有一定关系, 20~29 岁年龄段 HPV 感染率较高 (45.49%), 随着年龄增大感染率有所下降, 50~59 岁年龄段感染率又出现高峰, 达 52.24%。并且, 随年龄增长, 低危亚型感染率下降, 高危亚型感染率持续升高, 这可能与病毒不同型别的侵袭力和患者免疫状态相关^[6-7]。≥60 (下转第 688 页)

1.5 统计学方法 采用 SAS9.0 软件进行统计。资料分类采用 χ^2 检验,各单项症状体征采用秩和检验。定量指标采用配对 t 检验及 χ^2 检验,比较组内治疗前后差异,对组间采用成组 t 检验及 χ^2 检验,比较组间前后差值。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 临床疗效 经积极治疗后,试验组显效 20 例(37.7%),有效 31 例(58.4%),总有效率达 96.1%。对照组显效 15 例,有效 23 例,总有效率达 71.7%。经统计学分析发现试验组总有效率明显高于对照组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

表 2 两组疗效比较

组别	n	显效	有效	无效	总有效率(%)
试验组	53	20	31	2	96.1*
对照组	53	15	23	15	71.7

注:与对照组相比,* $P < 0.05$ 。

2.2 不良反应 治疗前后两组患儿的血、尿、便常规、肝肾功能、心电图均无异常变化,也未见对头孢地嗪和痰热清过敏患儿。

3 讨 论

小儿肺炎是常见的肺部急性炎症,其临床表现轻重不一,主要表现为发热、咳嗽、气促、呼吸困难或伴有头痛、咽痛、胸骨下疼痛等,可合并其他肺外症状^[4-8]。头孢地嗪为半合成、第三代头孢霉素广谱抗药物,对革兰阳性菌、阴性菌均有抗菌活性,对 β -内酰胺酶稳定,对头孢菌素酶和青霉素酶极稳定,是目前唯一兼具广谱强力抗菌和免疫调节活性双重作用的头孢类抗生素,且不良反应小,符合婴幼儿抗感染的需要。头孢地嗪容易引起药物热、皮疹、胃肠道功能紊乱、血小板减少、白细胞减少、嗜酸性细胞增多、血清丙氨酸氨基转移酶和尿素氮暂时升高以及腹泻等不良反应。另外该药治疗小儿肺炎的疗程长,病灶难以清除,使得头孢地嗪在临床上并不为患儿家长所认同。痰热清注射液中的金银花、连翘、黄芩、山羊角、熊胆粉等能够清热、解毒、化痰,能使痰液稀释有利于排出,改善通气功能,减轻咳嗽等症状。因而加速了控制感染的时间,明显地缩短了病程,减少了西药不良反应的发生。因此,本文采用痰热清联合

头孢地嗪治疗小儿肺炎,并与单独用药组进行疗效对比,结果显示试验组显效 20 例,占 37.7%,有效 31 例,占 58.4%,总有效率达 96.1%。对照组显效 15 例,有效 23 例,总有效率达 71.7%。经统计学分析发现试验组总有效率明显高于对照组,且差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

综上所述,痰热清注射液联合头孢地嗪治疗小儿肺炎疗效显著,缩短了疗程,不良反应轻微且发生率低,安全性高,值得临床推广使用。

参考文献

- [1] 黄金莲,应雄江,胡苏球. 132 株鲍氏不动杆菌耐药性监测与分析[J]. 中国抗生素杂志,2004,29(2):96-98.
- [2] Fisher M, Takano K. The penumbra, therapeutic time window and acute ischaemic stroke [J]. Baillieres Clin Neurol, 1995, 4(2):279-295.
- [3] 万瑞香,隋忠国,李自普. 新编儿科药理学[M]. 2 版. 北京:人民卫生出版社,2006:75.
- [4] Qin J, Chen D, Hu H, et al. Surface modification of RGD-liposomes for selective drug delivery to monocytes/neutrophils in brain[J]. Chem Pharm Bull(Tokyo), 2007, 55(8):1192-1197.
- [5] 王辉,刘颖梅,陈民钧,等. 鲍曼不动杆菌对碳青霉烯类耐药机制的研究[J]. 中国医学科学院学报,2003,25(5):567-572.
- [6] Zivot J, Hoffman WD. Pathogenic effects of endotoxin [J]. New Horiz, 1995, 3(2):267-275.
- [7] 宋志香,芦苇,陈亮,等. 痰热清与万古霉素治疗耐甲氧西林金黄色葡萄球菌性肺炎及其耐药性研究[J]. 中华医院感染学杂志,2009,19(14):1861-1863.
- [8] Towner KJ. Clinical importance and antibiotic resistance of Acinetobacter spp. Proceedings of a symposium held on 4-5 November 1996 at Eilat, Israel [J]. J Med Microbiol, 1997, 46(9):721-746.

(收稿日期:2012-09-10 修回日期:2013-01-01)

(上接第 686 页)

岁组因病例数太少,结果并不能反映真实情况,仅作参考。

综上所述,用流式荧光杂交法检测 HPV,可进行基因分型,是目前先进、实用的 HPV 基因分型方法,应用于 HPV 感染普查和宫颈疾病高危人群的监控,值得在临床推广应用。

参考文献

- [1] Bosch FX, Lorincz N, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer[J]. J Clin Pathol, 2002, 55(4):244-265.
- [2] 唐隽,郝飞. HPV 逃避宫颈宿主免疫应答的机制[J]. 免疫学杂志,2011,28(7):625-631.
- [3] 俞钱,徐红星,朱琴芳. 流式荧光杂交法检测人乳头瘤病毒基因型在临床中的应用[J]. 临床检验杂志,2010,28

(4):262-263.

- [4] Dunne EF, Unger ER, Sternberg M, et al. Prevalance of HPV infection among female in the United States[J]. JAMA, 2007, 297(8):813-819.
- [5] 孟晓,赵应斌,梁志东. HPV 感染的 FQ-PCR 检测结果分析[J]. 基础医学论坛,2009,13(5):439-444.
- [6] 郭玉妹,孙捷,陈亚丹,等. HPV 检测及其在宫颈癌诊断中的意义[J]. 中国实验诊断学,2009,13(9):1306-1308.
- [7] 傅祝能,吴荣辉,郭小妹,等. 用流式荧光杂交技术调查浙江义乌妇女 HPV 感染及分型[J]. 临床检验杂志,2011,29(8):570-571.

(收稿日期:2012-08-02 修回日期:2012-07-25)