

采用 PCR-测序法对北京地区 325 例妇女宫颈脱落细胞样品中人乳头瘤病毒进行检测和基因分型

蔡玉品¹, 张瑞芬¹, 李源², 夏小雨², 向阳², 朱宝利¹, 杨毅²

1 中国科学院微生物研究所 中国科学院病原微生物与免疫学重点实验室, 北京 100101

2 中国医学科学院 北京协和医院妇产科, 北京 100730

摘要: 为了探讨 PCR-测序法在宫颈脱落细胞样品中人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 临床检测中的应用价值, 采用 HPV 通用引物 PGMY09/11 针对 HPV L1 区基因序列进行 PCR 扩增, 并通过 DNA 测序法对 HPV 进行基因分型。对于混合感染样品, 利用 HPV 型别特异性引物 PCR 的方法进行基因分型。325 例临床样品中, 228 例为 HPV 阳性, 其中 66 例为混合感染。共发现 27 种不同的 HPV 型别, 其中 HPV 16 比例最多, 其次是 HPV 58 和 52。高危型 HPV 检出率随病变程度加重显著性增加 ($P < 0.05$), 但混合感染的比例呈下降趋势 ($P < 0.05$)。在 21~30 岁年龄组中, HPV 感染率最高。PCR-测序法与 HC2 对高危型 HPV 检测的符合度较好 ($\kappa=0.675$)。PCR-测序法可有效地对宫颈脱落细胞样品进行 HPV 检测和基因分型, 对大规模的 HPV 筛查具有潜在的应用价值。

关键词: 人乳头瘤病毒, 宫颈病变, 聚合酶链式反应, DNA 测序, 基因分型

PCR-based sequencing for detection and genotyping of human papillomavirus in 325 cervical cell specimens from Beijing area

Yupin Cai¹, Ruifen Zhang¹, Yuan Li², Xiaoyu Xia², Yang Xiang², Baoli Zhu¹, and Yi Yang²

1 CAS Key Laboratory of Pathogenic Microbiology and Immunology, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China

2 Department of Obstetrics and Gynecology, Peking Union Medical College Hospital, Peking Union Medical College and Chinese Academy of Medical Sciences, Beijing 100730, China

Abstract: To evaluate PCR-sequencing for clinical detection of human papillomavirus (HPV) genotypes in cervical cell specimens, we applied PCR-sequencing to HPV detection and genotyping by general primer PGMY09/11, which targets the HPV most conserved L1 gene. Samples with multiple infections were subjected to HPV type-specific PCR. Among the 325 cervical

Received: March 16, 2011; **Accepted:** April 18, 2011

Supported by: Project of Beijing Municipal Science and Technology (No. D09050703570906), Key Infectious Diseases Program (No. 2009ZX10601), Knowledge Innovation Project of the Chinese Academy of Sciences.

Corresponding author: Yi Yang. Tel: +86-10-65296240; Fax: +86-10-65296874; E-mail: yangyi8835@126.com

北京市科技计划 (No. D09050703570906), 传染病重大专项 (No. 2009ZX10601), 中国科学院知识创新工程项目资助。

samples, 228 were HPV positive, of which 66 showed multiple infections. In all, 27 different HPV genotypes were identified, with HPV 16 being the most prevalent, followed by HPV 58 and 52. The prevalence of high-risk HPV infection increased with the severity of cervical lesions ($P<0.05$), whereas the proportion of multiple infections declined significantly from LSIL to SCC ($P<0.05$). Both rates of overall and high-risk HPV infection were the highest in 21-30 age groups. There was substantial agreement between the HC2 and PCR-sequencing assay for detection of high-risk HPV ($\kappa=0.675$). PCR-sequencing was effective in HPV detection and genotyping, and it could be potentially applied to large scale HPV screening.

Keywords: human papillomavirus, cervical lesions, PCR, DNA sequencing, genotyping

宫颈癌是女性当中第三大常见的恶性肿瘤, 全球每年约有 53 万的新发病例和 27 万的死亡病例, 其中 85% 发生在发展中国家^[1]。在中国, 宫颈癌的发病率和死亡率分别是十万分之 9.6 和十万分之 4.3, 但是在一些医疗卫生条件较差的农村, 宫颈癌的死亡率依然高居不下^[1-2]。大量研究表明, 人乳头瘤病毒 (Human papillomavirus, HPV) 的持续感染与宫颈癌的发生密切相关, 99.7% 以上的癌症患者当中可检测到 HPV 感染^[3-4]。目前已发现 100 多种 HPV 型别, 与宫颈癌发病密切相关的为高危型 HPV, 以 HPV 16 和 18 这两种高危型 HPV 感染最为普遍, 大约占到总感染者的 70%^[5]。HPV 型别在人群及宫颈癌病例中的分布也呈现明显的地域特征^[6]。

HPV 与宫颈癌的密切关系意味着对 HPV 早期筛查可有效地减少宫颈癌的发病率, 同时对 HPV 基因分型在分析不同型别的分布情况, 监控预后 HPV 再次感染和开发多价预防性疫苗等方面都起着至关重要的作用。HPV DNA 检测最常用的两种方法分别是经美国 FDA 认证的第二代杂交捕获法 (Hybrid capture 2, HC2) 和 HPV 通用引物 PCR 扩增。在 HPV 筛查方面, HC2 具有较高的灵敏度和特异性, 并且对宫颈中度不典型增生 (CIN2) 及 CIN2 以上的检测能力优于传统的细胞学检测^[7-8]。基于 PCR 的方法是针对序列高度保守的 L1 基因设计通用引物, 通过 PCR 反应扩增样品中所有 HPV。目前使用较多的 HPV 通用引物是 GP5+/6+、MY09/11 及其改良的 PGMY09/11^[9]。通用引物 PCR 的扩增产物可用限制片段长度多态性分析、反向线性杂交和基因芯片等方法实现基因分型。采用反向杂交技术开发的

商品化产品, 如罗氏 (Roche) 公司开发的 Linear Array HPV 分型试剂盒^[10]和 Innogenetics 的 INNO-LiPA HPV 分型试剂盒^[11], 在临床检测方面均显示出较好的灵敏度和检测混合感染的能力^[12-13]。但这些基于特异探针的分型方法存在与其他型别之间交叉杂交的缺点^[14-15], 并且检测 HPV 型别限于探针种类, 不能鉴别出较少见或者新的 HPV 型别。

近年来, 测序成本大幅度降低, 使得利用测序这种“金标准”方法有可能应用于 HPV 大规模的筛查。测序法理论上可以检测出所有感染的 HPV 型别, 能够更准确、全面地分析不同 HPV 型别的感染情况。本实验采用通用引物 PGMY09/11, 通过 PCR-测序法对宫颈脱落细胞中感染的 HPV 进行检测及基因分型, 分析各 HPV 型别在北京地区妇女中的感染率。同时将 PCR-测序法与 HC2 进行比较, 评估其在临床中应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 标本来源

宫颈脱落细胞标本由北京协和医院提供。标本的液基细胞学诊断 (Liquid-based cytology test) 由该院妇产科细胞室完成, 诊断标准采用 2001 年国际癌症协会 TBS 诊断系统^[8], 所有宫颈鳞癌的患者均经组织病理学确诊。

1.1.2 主要试剂和仪器

DNA 提取试剂盒 (QIAamp DNA Mini Kit) 购自 Qiagen 公司; 质粒提取试剂盒购自 Omega 公司; PCR 所用的 Ex HS *Taq* 酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 公

司; HC2 试剂盒购自 Digene 公司; HPV 16 基因组质粒购自 ATCC (number: 45 113); 所有引物均有上海生工生物工程有限公司合成; Sensoquest PCR 扩增仪; Nanodrop ND-1 000 微量紫外分光光度计; ABI Prism 3 730xl DNA 测序仪; DML 2 000 荧光光度计。

1.2 DNA 提取

液基细胞制片后, 保存液中还剩余充足数量的细胞用于总 DNA 的提取。取 1.5 mL 临床样品, 8 000 r/min 离心 1 min 后弃上清液, 用 1 mL PBS 缓冲液冲洗一次。DNA 提取过程按照试剂盒操作说明书进行, 最后用 100 μ L AE 缓冲液洗脱。DNA 浓度通过 Nanodrop spectrometer DNA 浓度测定仪进行测定。DNA 质量通过 PCR 扩增看家基因 β 球蛋白基因 (β -globin) 来鉴定, 引物序列为: GH20 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'; PC04 5'-CAACTTCATCCACGTTCACC-3'。PCR 产物电泳时在 268 bp 处出现明亮的条带则说明样品 DNA 提取合格。

1.3 灵敏度分析

HPV 16 质粒用 Omega 质粒提取试剂盒按照操作要求进行提取并用 Nanodrop 测定质粒的浓度大小。根据质粒长度和碱基对的平均相对分子量计算质粒的拷贝数 (<http://www.uri.edu/research/gsc/resources/cndna.html>)。将母液调整至 5×10^{10} copies/ μ L, 并依次进行 10 倍梯度稀释至 5 copies/ μ L。为了使梯度稀释的标准品更接近样品中提取的 DNA, 稀释缓冲液中加入浓度为 12.5 ng/ μ L 的人基因组 DNA。选取 5×10^4 、 5×10^3 、 5×10^2 、50 和 5 copies/ μ L 五个浓度梯度分析通用引物 PGMY09/11 PCR 的灵敏度。

1.4 HPV 检测和基因分型

采用 HPV 通用引物 PGMY09/11 扩增 HPV L1 基因^[17]。该引物在通用引物 MY09/11 的基础上进行了完善, 将含有简并碱基的两条序列改良为由 5 条上游引物和 13 条下游引物组成混合引物, 从而提高了检测的灵敏度和可重复性。PCR 反应总体

积为 50 μ L, 包括 1 \times PCR 缓冲液, 200 μ mol/L dNTPs, 0.25 μ mol/L 上游引物和下游引物, 1.25 U Ex HS *Taq* 酶, 2 μ L DNA 模板。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 9 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 40 个循环; 72 $^{\circ}$ C 9 min。每次反应都分别以灭菌双蒸水和 HPV 16 质粒作为阴性和阳性对照。PCR 产物通过 1.5% 琼脂糖凝胶电泳分析, 如果在 450 bp 处有一条明亮的条带则说明样品感染了 HPV。对含有目的条带的 PCR 样品送北京诺赛基因组研究中心进行测序。测序结果经 Sequence Scanner (Applied Biosystems) 软件分析, 若每个碱基位点都只有单一的峰则为单一感染; 反之, 多个碱基位点出现套峰或叠峰则视为多种 HPV 型别混合感染。将 HPV 单一感染样品的测序结果与 GenBank 核酸数据库进行 Blast 比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 以确定其感染的 HPV 型别。本研究中高危型 HPV 包括 HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59 和 68。其他 HPV 型别归为低危型。

1.5 HPV 型别特异引物 PCR (type-specific PCR, TS-PCR)

对于混合感染的样品, 采用 12 对型别特异引物 (HPV 16, 18, 31, 33, 35, 39, 51, 52, 56, 58, 66 和 68) 进行基因分型。引物序列及 PCR 反应条件如 Sotlar 所述^[18], 所有引物皆经过本实验严格验证不存在型别之间的交叉反应。对含有目的条带的 PCR 样品进一步通过测序和序列比对来确认其型别。

1.6 HC2 检测

高危型 HPV DNA 的检测按照 HC2 试剂盒说明书要求进行操作。诊断阳性指标定为样品中相对光单位 (Relative light unit, RLU) 与阳性对照的比值 ≥ 1.0 , 相当于 HPV DNA 浓度为 1.0 pg/mL。

1.7 统计学分析

用软件 SPSS 13.0 对各组结果进行统计分析。不同宫颈病变中 HPV 和混合感染检出率差异的比较, 以及按照年龄分组 HPV 检出率的比较均采用 χ^2 检

验。PCR-测序法与 HC2 对高危型 HPV 检测的符合度通过计算 kappa 值来评估。 $P < 0.05$ 说明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞学诊断

自 2009 年 7 月份至 2010 年 3 月份从北京协和医院妇产科门诊收集到 325 例临床标本, 患者的年龄范围从 21 岁到 66 岁, 平均年龄为 40.4 岁。其细胞学诊断结果为正常 (Normal) 102 例, 宫颈低度鳞状上皮内病变 (LSIL) 51 例, 意义不明的非典型鳞状细胞 (ASCUS) 97 例, 宫颈高度鳞状上皮内病变 (HSIL) 48 例, 宫颈鳞癌 (SCC) 27 例 (图 1)。

2.2 灵敏度分析

为了证明 PGMY09/11 PCR 可有效地检测样品中的 HPV, 我们利用浓度梯度稀释的 HPV 16 质粒来分析该方法的检测限。从图 2 可以看出质粒拷贝数在 $10^3 \sim 10^5$ 之间时, PCR 扩增之后可以看到在 450 bp 处明亮的条带; 质粒拷贝数在 10^2 时, 可以看到条带但强度稍弱, 但切胶纯化后依然可以测序成功。HPV 16 质粒拷贝数低于 10^2 时, 则看不到目的条带, 说明该方法对 HPV 16 的检测灵敏度为 10^2 个拷贝。

2.3 HPV 检测和基因分型

收集的所有临床样品都进行了总 DNA 的提取, 并通过 PCR 扩增 β -globin 验证了所提取 DNA 的质量也都是合格的。总的来说, 经通用引物 PGMY09/11 PCR 扩增检测到 228 例 (70.2%) 患者感染 HPV, 其中单一感染 162 例 (70.1%), 混合感染 66 例 (28.9%)。结合 TS-PCR 对所有混合感染的样品分型后, 共发现 27 种不同的 HPV 型别和 283 条 HPV L1 序列片段, 其中 HPV 16 感染者最多, 共检测出 71 例 (25.1%), 其次是 HPV 58 (15.2%) 和 52 (11.3%)。其他出现较多的型别依次是 HPV 68, 56, 66, 18, 33, 51 和 31 (图 3)。这 10 种 HPV 感染占总数的 83.0%。

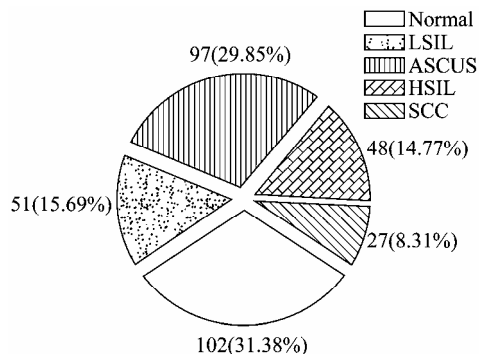


图 1 325 例患者的液基细胞学诊断结果

Fig. 1 Liquid-based cytology result of 325 cervical samples. LSIL: low-grade squamous intraepithelial lesion; ASCUS: atypical squamous cells of undermined significance; HSIL: high-grade squamous intraepithelial lesion; SCC: squamous cells carcinoma.

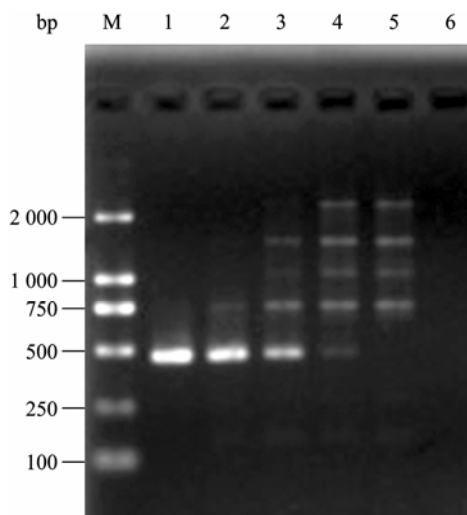


图 2 PGMY09/11 PCR 对 HPV 16 检测的灵敏度实验

Fig. 2 The sensitivity of PGMY09/11 PCR assay on serial dilutions of HPV 16 plasmid DNA. M: DNA marker DL 2000; 1: 10^5 copies; 2: 10^4 copies; 3: 10^3 copies; 4: 10^2 copies; 5: 10 copies; 6: negative control.

尽管本研究中 HPV 总的感染率在 LSIL 中表现得最高, 但高危型 HPV 检出率随着病变程度的加重趋势性增加, 从正常中的 12.7% 上升至宫颈鳞癌中的 85.2% ($P < 0.05$), 而低危型 HPV 感染在癌前病变较为普遍并且所占比例也随着病情发展逐渐下降 (图 4)。混合感染所占的比例在不同的宫颈病变中也不同, 并且随着病变程度的加重呈

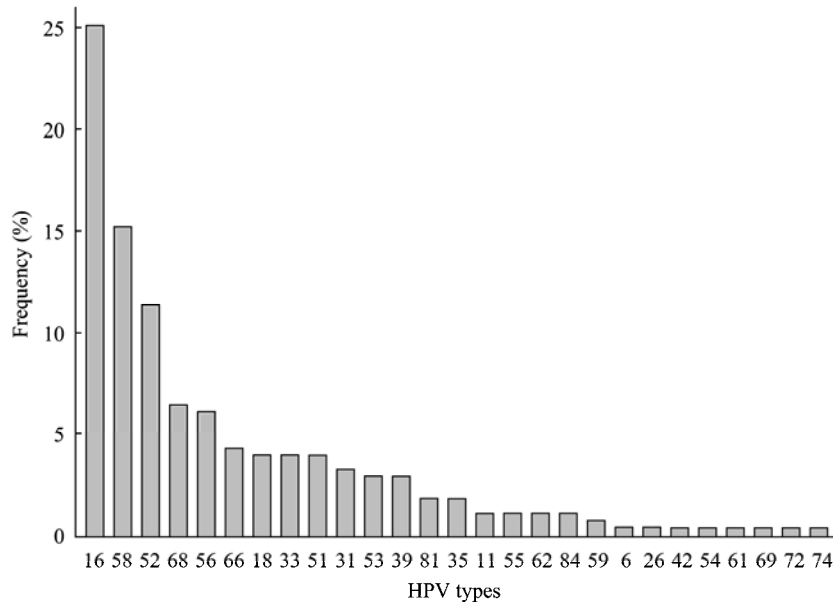


图3 325例宫颈脱落细胞样品中不同HPV型别的感染率

Fig. 3 The prevalence of different HPV types in 325 cervical samples.

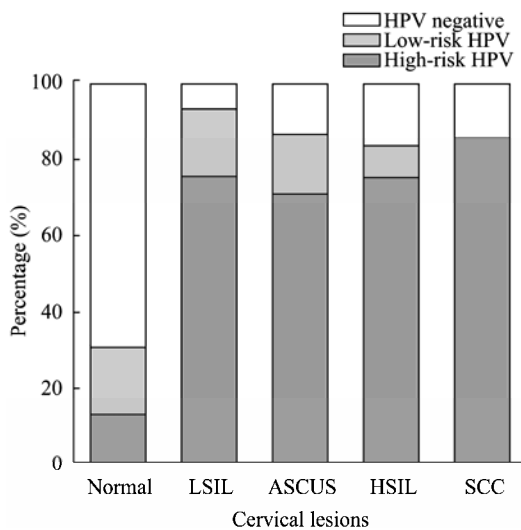


图4 HPV感染在不同程度宫颈病变中的分布

Fig. 4 The distribution of HPV infection in different cervical lesions.

现下降的趋势,从LSIL中的38.9%下降至SCC中的13% ($P<0.05$)。

为了分析HPV感染与年龄之间的关系,我们将所有的患者分为4个年龄组(图5)。HPV感染率在

21~30岁年龄组表现得最高(88.4%),其中高危型HPV感染率将近高达80%。从20~50岁这个年龄段,总的HPV感染率及高危型HPV感染率都随着年龄的增加显著性降低($P<0.05$)。在50岁之后,总的HPV感染率基本保持不变,但高危型HPV感染略有增加。

2.4 PCR-测序法与HC2的比较

共有111个样品进行了HC2检测,包括70个HC2阳性和41个HC2阴性。PCR-测序法与HC2对高危型HPV检测结果如表1所示。总的来说,两种方法同时检测HPV阳性和阴性的样品数分别是54和39,一致性为83.8% ($\kappa=0.675$)。检测结果不一致的18个样品中,有16个(88.9%)表现为HC2阳性,但PCR-测序结果为阴性,其中的9个样品PCR-测序法检测出低危型HPV感染,包括HPV 11(1个), HPV 42(1个), HPV 53(2个), HPV 55(2个), HPV 59(1个), HPV 69(1个)和HPV 81(1个)。2例HC2阴性但PCR-测序结果阳性的样品均感染HPV 16。

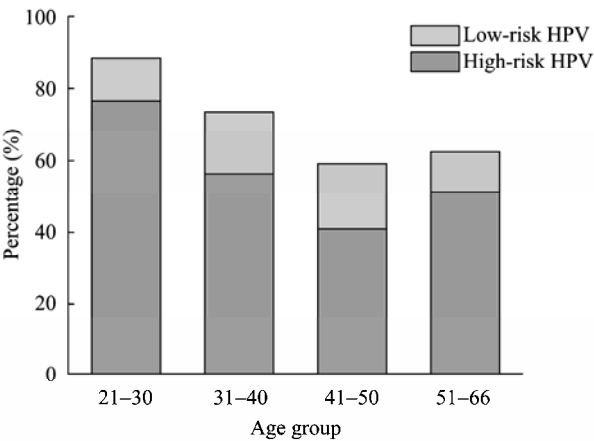


图 5 HPV 在不同年龄组的感染情况
Fig. 5 The distribution of HPV infection in each age group.

表 1 比较 PCR-测序和 HC2 两种方法对高危型 HPV 的检测
Table 1 Comparison of PCR-sequencing and HC2 for the detection of high-risk HPV

HC2	PCR-sequencing	
	Positive ^a	Negative
Positive	54	16
Negative	2	39

^a Multiple infections with the presence of at least one high-risk type were considered as high-risk HPV positive.

3 讨论

我们采用 PCR-测序法检测 HPV DNA, 通过一次通用引物 PCR 扩增可以做大范围临床标本的 HPV 基因筛查。通过对 325 例临床样品的检测, 发现总的 HPV 感染率较高 (70.2%), 主要原因是所收集的样品大部分细胞学诊断结果为宫颈癌或癌前病变, 而在 LSIL、HSIL 和宫颈癌患者中, HPV 感染情况与之前的报道类似^[6]。但在细胞学诊断结果为正常的这部分样品中, 高危型 HPV 的感染率略高一些^[19]。可能的原因一方面是我们的方法灵敏度更高, 可以检测到低拷贝 HPV 的感染, 另一方面是为了得到更多的 HC2 阳性的样品而忽视其细胞学诊断结果, 导致一部分 HC2 阳性的样品细胞学诊断却是正常。

本研究共发现 27 种不同的 HPV 型别, 多于 Zhao 等之前对北京妇女 HPV 筛查所报道的 21 种^[20]。这是因为我们采用了灵敏更高且鲁棒性 (Robustness) 更强的 PGMY09/11, 并且分型的方法是 DNA 测序法, 理论上可以检测到所有感染的 HPV 型别; 而之前的研究所用的反向斑点杂交 (Reverse dot blot hybridization) 法基因分型的范围仅局限检测于高危型及几种常见的低危型 HPV。在所有型别中, 我们发现 HPV 16、58 和 52 检出率较高, 与 Bao 等对中国人群的 Meta 分析结果类似^[21]。HPV 58 和 52 感染率在中国多个地区感染率都较高, 南部地区 (广州和香港) 比其他地区 (上海, 四川和北京) 表现更高一些^[22]。因此, 在开发 HPV 多价疫苗的时候除了针对 HPV 6、11、16 和 18 之外, 也可以将 HPV 58 考虑在内, 这将会有效地预防中国人群中第 2 大常见的 HPV 型别。HPV 18 在本研究中所占的比例较低, 仅排在第 7 位, 这是因为 HPV 18 常见于宫颈癌患者中, 而我们的样品中宫颈癌患者数目较少^[23]。

本研究还发现在 21~30 岁这个年龄组, 总的 HPV 感染及高危型 HPV 感染均为最高, 随后呈现一定的下降趋势。其他研究也发现 HPV 感染具有类似的年龄分布特点^[20]。这种变化趋势与 HPV 感染的特点有关, 因为 HPV 感染具有自限性, 一部分感染会在机体免疫作用下清除。

为了分析 PCR-测序法的临床可行性, 我们比较了 PCR 和 HC2 这两种方法对高危型 HPV DNA 的检测结果。研究表明, 这两种方法有较好的符合度, 而有差异结果的部分主要是由于 HC2 与低危型 HPV 交叉反应所致, 从而导致了假阳性的出现。最近有文献报道, 大约有 10% 的 HC2 阳性是由交叉反应造成^[24]。这将会给部分患者带来不必要的经济负担和心理压力。此外, 2 例 HC2 阴性但 PCR 检测为阳性的样品, 分型结果都是 HPV 16, 提示 HC2 在检测灵敏度方面还存在一定的不足。HC2 是利用对抗体捕获信号的放大和化学发光信号的检测, 一次性检

测 13 种高危型 HPV 型别。该方法对检测设备要求高, 检测试剂费用较贵, 并且不能对检测到的 HPV 进行基因分型。近年来, 虽然美国和欧洲一些国家通过筛查 HPV 显著降低了宫颈癌的发病率, 但是在中国和其他一些发展中国家, HC2 并不能大规模的应用于 HPV 筛查。建立一种快速、灵敏度高且成本较低的 HPV 检测方法将会对这些地区宫颈癌的预防有着重要的意义。PCR 因具有快速、灵敏且特异性强等优点, 在临床检测方面已得到广泛应用, 而 DNA 测序法理论上可以准确地对所有 HPV 进行基因分型。总之, PCR-测序法可有效地对宫颈脱落细胞样品进行 HPV 检测和基因分型, 对大规模的 HPV 筛查具有潜在的应用价值。

REFERENCES

- [1] Jemal DA, Bray F, Center MM, et al. Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin*, 2011, 61(2): 69–90.
- [2] Yang L, Parkin DM, Li L, et al. Time trends in cancer mortality in China: 1987–1999. *Int J Cancer*, 2003, 106(5): 771–783.
- [3] Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer world-wide. *J Pathol*, 1999, 189(1): 12–19.
- [4] Bosch FX, Lorincz A, Muñoz N, et al. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*, 2002, 55(4): 244–265.
- [5] Muñoz N, Bosch FX, de Sanjosé S, et al. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med*, 2003, 348(6): 518–527.
- [6] 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. *Int J Cancer*, 2007, 121(3): 621–632.
- [7] Salmeron J, Lazcano-Ponce E, Lorincz A, et al. Comparison of HPV-based assays with Papanicolaou smears for cervical cancer screening in Morelos State, Mexico. *Cancer Causes Control*, 2003, 14(6): 505–512.
- [8] Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA*, 2000, 283(1): 87–93.
- [9] Villa LL, Denny L. Methods for detection of HPV infection and its clinical utility. *Int J Gynecol Obstet*, 2006, 94(S1): S71–S80.
- [10] Coutlee F, Rouleau D, Petignat P, et al. Enhanced detection and typing of human papillomavirus (HPV) DNA in anogenital samples with PGMY primers and the Linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(6): 1998–2006.
- [11] Didelot-Rousseau MN, Courgnaud V, Nagot N, et al. Comparison of INNO-LiPA HPV Genotyping v2 with PCR product subcloning and sequencing for identification of genital human papillomavirus genotypes in African women. *J Virol Methods*, 2006, 135(2): 181–185.
- [12] Fontaine V, Mascaux C, Weyn C, et al. Evaluation of combined general primer-mediated PCR sequencing and type-specific PCR strategies for determination of human papillomavirus genotypes in cervical cell specimens. *J Clin Microbiol*, 2007, 45(3): 928–934.
- [13] van Hamont D, van Ham MA, Bakkers JM, et al. Evaluation of the SPF10-INNO LiPA human papillomavirus (HPV) genotyping test and the roche linear array HPV genotyping test. *J Clin Microbiol*, 2006, 44(9): 3122–3129.
- [14] Johnson T, Bryder K, Corbet S, et al. Routine genotyping of human papillomavirus samples in Denmark. *APMIS*, 2003, 111(3): 398–404.
- [15] Asato T, Maehama T, Nagai Y, et al. A large case-control study of cervical cancer risk associated with human papillomavirus infection in Japan, by nucleotide sequencing-based genotyping. *J Infect Dis*, 2004, 189(10): 1829–1832.
- [16] Solomon D, Davey D, Kurman R, et al. The 2001 Bethesda System: terminology for reporting results of cervical cytology. *JAMA*, 2002, 287(16): 2114–2119.
- [17] Gravitt PE, Peyton CL, Alessi TQ, et al. Improved amplification of genital human papillomaviruses. *J Clin Microbiol*, 2000, 38(1): 357–361.
- [18] Sotlar K, Diemer D, Dethleffs A, et al. Detection and typing of human papillomavirus by e6 nested multiplex PCR. *J Clin Microbiol*, 2004, 42(7): 3176–3184.
- [19] 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. Lancet, 2005, 366(9490): 991–998.

[20] Zhao R, Zhang WY, Wu MH, et al. Human papillomavirus infection in Beijing, People's Republic of China: a population-based study. Br J Cancer, 2009, 101(9): 1635–1640.

[21] Bao YP, Li N, Smith JS, et al. Human papillomavirus type-distribution in the cervix of Chinese women: a meta-analysis. Int J STD AIDS, 2008, 19(2): 106–111.

[22] Lo KW, Wong YF, Chan MK, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a multicenter study in China. Int J Cancer, 2002, 100(3): 327–331.

[23] Chen W, Zhang X, Molijn A, et al. Human papillomavirus type-distribution in cervical cancer in China: the importance of HPV 16 and 18. Cancer Causes Control, 2009, 20(9): 1705–1713.

[24] Castle PE, Solomon D, Wheeler CM, et al. Human papillomavirus genotype specificity of hybrid capture 2. J Clin Microbiol, 2008, 46(8): 2595–2604.



本期广告索引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	生物谷网站	内 页
宝生物工程 (大连) 有限公司	封 二	镇江东方生物工程公司	内 页
北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司	内 页	安琪酵母股份有限公司	内 页