

· 实验研究与卫生检验 ·

高危型人乳头瘤病毒核酸(分型)检测试剂的临床应用初步评价

陈艳敏¹, 王利军², 陈梅卫³, 周建³, 邓中平⁴

1. 广州医科大学附属深圳沙井医院 广东 深圳 518104; 2. 深圳市福田区妇幼保健院 广东 深圳 518017;
3. 圣维尔医学检验中心 湖南 长沙 410205 4. 湖南省核酸诊疗工程技术研究中心 湖南 长沙 410205

摘要: 目的 通过对正常人群样本、宫颈癌样本的检测,评估市售实时荧光定量 PCR 方法学高危型 HPV 分型检测试剂临床应用性能。方法 分别采用两种荧光 PCR 检测试剂(A 试剂与 B 试剂)对 1 000 例的体检样本、48 例宫颈鳞癌样本和 18 例宫颈腺癌样本进行 HPV DNA 检测并对比其结果,评价其临床应用性能。结果 A 试剂与 B 试剂检测体检样本阳性率分别为 18.5% 和 16.5%。14 种 HPV 型别阳性一致性百分比为 97.57%, 阴性一致性百分比为 98.78%, 总一致性百分比为 98.58%。A 试剂与 B 试剂检测 48 例宫颈鳞癌样本阳性率分别为 100% 和 95.83%, 其中 HPV16 型(66.7%)、58 型(14.6%)、18 型(10.4%) 所占比例较高。18 例宫颈腺癌样本阳性率分别为 83.33% 和 77.78%, HPV16 型(50%)、18 型(27.7%) 和 51 型(11.1%) 所占比例较高。通过比较发现 A 试剂在宫颈鳞癌和腺癌样本中的阳性检出率较 B 试剂高。结论 通过检测对比,两种试剂一致性较好,而 A 试剂检测下限更低,检测性能更好,更适用于人群宫颈病变的早期检测与筛查,具有较高的临床应用价值。

关键词: 高危型人乳头瘤病毒; HPV DNA; 荧光定量 PCR; 宫颈癌

中图分类号: R373.33 文献标识码: B 文章编号: 1006-3110(2019)10-1267-04 DOI: 10.3969/j.issn.1006-3110.2019.10.032

Preliminary evaluation on clinical application of high-risk human papillomavirus DNA (genotype) diagnostic kit

CHEN Yan-min¹, WANG Li-jun², CHEN Mei-wei³, ZHOU Jian³, DENG Zhong-ping⁴

1. Shenzhen Shajing Hospital Affiliated to Guangzhou Medical University, Shenzhen, Guangdong 518104, China;
2. Maternal and Child Health Hospital of Futian District, Shenzhen, Guangdong 518017, China;
3. Sanway Clinical Laboratories Inc., Changsha, Hunan 410205, China;
4. Hunan Provincial Research Center for Technologies for Nucleic Acid-Based Diagnostics and Therapeutics, Changsha, Hunan 410205, China
Corresponding author: DENG Zhong-ping E-mail: dzp2007kc@163.com

Abstract: **Objective** To evaluate the clinical application performance of marketed commercial high-risk human papillomavirus (HPV) DNA (genotype) diagnostic kits based on real-time fluorescent quantitative PCR method by testing normal population samples and cervical cancer samples. **Methods** Two kinds of HPV diagnostic kits (reagents A and B) based on fluorescent quantitative PCR were separately used to detect HPV DNA in 1 000 physical examination samples, 48 cervical squamous cell carcinoma samples and 18 cervical adenocarcinoma samples, the results were compared and the clinical application performances of the two reagents were evaluated. **Results** The positive rates of the physical examination samples detected by reagents A and B were 18.5% and 16.5% respectively. The positive, negative and total coincidence rates of 14 kinds of HPV genotypes were 97.57%, 98.78% and 98.58% respectively. The positive rates of 48 cervical squamous cell carcinoma tissue samples detected by reagents A and B were 100% and 95.83% respectively, of which HPV types 16 (66.7%), 58 (14.6%) and 18 (10.4%) accounted for a higher proportion. The positive rates of 18 cervical adenocarcinoma tissue samples detected by reagents A and B were 83.33% and 77.78% respectively, of which HPV types 16 (50%), 18 (27.7%) and 51 (11.1%) accounted for a higher proportion. The comparison results revealed that the positive rates of cervical squamous cell carcinoma and adenocarcinoma tissue samples detected by reagent A were higher than those detected by reagent B. **Conclusions** A comparison of the detection results indicates that the two reagents are in good consistency. Reagent A shows a lower detection limit and better detection performance, it is more suitable for the early detection and screening of cervical lesions in population, with high clinical application value.

Key words: high-risk human papillomavirus; HPV DNA; fluorescent quantitative PCR; cervical cancer

作者简介: 陈艳敏,女,本科学历,主管技师,主要从事分子生物学及临床血液学检验工作。

通信作者: 邓中平, E-mail: dzp2007kc@163.com。

人乳头瘤病毒(human papillomavirus, HPV)是一类分子量较小的无包膜的双链环状DNA病毒,专性感染和寄生人体生殖器官及其它组织器官的上皮细胞。人乳头瘤病毒型别约有100多种,在临床上,根据HPV不同基因型致病力大小或致癌危险性大小不同可将HPV分为高危型和低危型两大类:低危型HPV一般与尖锐湿疣或低级别鳞状上皮内病变相关,检测的临床价值尚不明确;高危型HPV除可引起外生殖器疣外,更重要的是引起外生殖器癌、宫颈癌及高度子宫颈上皮内瘤变。依据世界卫生组织的国际癌症研究机构及其他国际组织的研究成果,将HPV16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68等13种基因型列为高危型别,26、53、66、73、82等5种基因型列为中等风险型别。宫颈癌是目前人类所有癌症中唯一病因明确的癌症,也是第一个可防、可控、可治的癌症。由于高危型人乳头状瘤病毒与宫颈癌的发病密切相关,99.7%的子宫颈癌患者都可检测到高危人乳头状瘤病毒DNA^[1]。国际公认人乳头状瘤病毒分型检测是宫颈癌最重要的筛查方法之一,因此快速、准确的检测出HPV高危型感染,可以预测宫颈病变发生的风险度,从而决定筛查的间隔、处理方案的制定及治疗后随访,对于早期治疗和降低宫颈癌的发病率和死亡率等具有重要的意义。

迄今,HPV难于用传统的病毒培养及血清学技术检测,主要实验诊断技术是基于核酸检测的分子生物学方法,主要有核酸杂交法^[2]、基因芯片^[3-4]以及PCR法^[5]等。其中实时荧光定量PCR(fluorescent quantitative polymerase chain reaction, FQ-PCR)是近几年兴起的一种融汇了PCR高敏感性、探针杂交高特异性和光谱检测高精确性等技术优点的检测技术^[6],具有早期、高特异、高敏感、可定量等优点,对于HPV感染的辅助诊断及宫颈癌的早期筛查有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 研究对象 本次研究的正常人群样本来自2017年1月-2018年12月年沙井人民医院的体检样本1000例,均为常规体检的女性宫颈脱落细胞,-20℃冰箱保存。研究中的66例宫颈癌样本中,包含了宫颈鳞癌样本48例,宫颈腺癌样本18例,均为石蜡组织样本,来自2017-2018年湖南圣维尔医学检验中心。

1.2 研究试剂和仪器 HPV核酸提取试剂:核酸(DNA)提取试剂盒(磁珠法)(湖南圣湘生物科技有限公司,长沙),用于提取并纯化石蜡组织样本中核酸。HPV核酸检测试剂盒:高危型人乳头瘤病毒核酸(分

型)检测试剂盒(湖南圣湘生物科技有限公司,长沙)(以下简称“A试剂”)检测型别16、18、31、33、35、39、45、51、52、53、56、58、59、66、68,最低检测限为400 copies/ml;高危型人乳头瘤病毒(HPV)核酸测定试剂盒(上海之江生物科技股份有限公司,上海)(以下简称“B试剂”)检测型别16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、66、68、82,最低检测限为 1×10^4 copies/ml。A、B两种试剂共同检测1、4种型别,不同的是A试剂可检测53型,B试剂可检测82型。核酸扩增仪采用宏石SLAN-96P扩增仪。

1.3 方法 A试剂体检样本处理:从无菌样本管中吸取1 ml样本至1.5 ml灭菌离心管,瞬时离心后吸取50 μ l至另一1.5 ml灭菌离心管中,加入50 μ l核酸释放剂,充分混匀后作为待测样本备用,取10 μ l作为PCR反应液模板。B试剂体检样本处理:取1 ml(如果分泌物多,仅取200 μ l)的细胞保存液样本至新的1.5 ml离心管,13 000 rpm离心5 min弃去上清,沉淀加无菌生理盐水1 ml,13 000 rpm离心5 min弃上清,沉淀直接加入100 μ l的核酸提取液,混匀,100℃煮沸10 min,然后13 000 rpm离心5 min,取上清4 μ l作为PCR反应液模板。宫颈鳞癌和腺癌组织样本处理:取3~5片切片样本至1.5 ml离心管,加入600 μ l溶液1,95℃加热10 min,冷却至60℃,加入60 μ l的蛋白酶K,57℃孵育30 min,100℃加热10 min使蛋白酶K失活,13 000 rpm,15 min,冷却硬化上层石蜡,吸取下层溶液200 μ l至新的1.5 ml离心管,加入600 μ l溶液1,混匀,95℃加热10 min,加入100 μ l溶液2,50 μ l的磁珠,混匀,静置20 min,上磁力架,吸附3 min,弃废液。加入600 μ l的溶液3和200 μ l的溶液4,混匀,上磁力架,吸附3 min,弃废液,静置1 min,再次弃废液加入50 μ l TE,混匀,静置5 min,上磁力架,吸附3 min,回收所得溶液,为PCR反应液模板。PCR扩增:A试剂和B试剂反应液分别按照说明书进行配制,添加模板,设置程序,上机检测。

1.4 复核检测方法 测序方案:A试剂和B试剂仅有一方检测出单独感染或多重感染,而另一方未检出该型别时,则采用该型别的特异性引物对该阳性样本进行单独扩增测序,将序列通过比对,确定型别。

1.5 统计学分析 将A试剂与B试剂检测结果数据采用SPSS 15.0软件kappa检验一致性分析。Kappa值的参考评价原则如下:0.75< κ ≤1时,诊断一致性好;0.4< κ ≤0.75时,诊断一致性一般;0≤ κ ≤0.4时,诊断一致性差。

2 结果

2.1 两种方法检测阳性率和各型别比例 A 试剂和

B 试剂检测体检样本,检测阳性率以及各型别所占比例见表 1。

表 1 A 试剂和 B 试剂检测 HPV 各型别结果分析(%)

试剂种类	阳性	16 型	18 型	31 型	33 型	35 型	39 型	45 型	51 型	52 型	53 型	56 型	58 型	59 型	66 型	68 型	82 型
A 试剂	18.5	4.6	1.1	1.4	1.8	0.6	1.1	1	2.8	4.1	2.0	3.2	3.9	1.9	0.8	2.7	-
B 试剂	16.5	4.2	1	1.2	1.8	0.5	1.1	0.9	2.8	3.9	-	3.2	3.8	1.8	0.9	2.6	0.2

通过两种试剂对 1 000 例样本进行检测, A 试剂阳性率为 18.5%, B 试剂阳性率为 16.5%, 其中 16 型、52 型、58 型、56 型、51 型、68 型和 53 型在各型别中所占比例较高。A 试剂检测出 12 例 53 型单型感染, 还有 8 例 53 型与其他高危型的混合感染, B 试剂检测出 2 例 82 型单型感染, 通过测序复核, 结果一致。

2.2 两种方法检测试剂结果比较 排除 53 型和 82 型, 根据检测结果将临床样本分为 HPV14 种高危型阳性组和阴性组, 统计结果见表 2。

表 2 A 试剂与 B 试剂对 14 种高危型 HPV 型别的检测结果

实验	B 试剂		合计
	高危 14 种型别阳性	高危 14 种型别阴性	
A 试剂	161	10	171
	4	811	815
总数	165	821	986

对比 A 试剂与 B 试剂的检测结果, 对符合试验方案要求的受试者样本数据进行数据统计分析, 计算二者的 HPV14 种高危型阳性一致性百分比、阴性一致性百分比、阴阳性检测总一致性百分比和 HPV14 种高危型分型一致性百分比。HPV14 种高危型阳性一致性百

分比 = $161 / (161 + 4) \times 100\% = 97.57\%$; HPV14 种高危型阴性一致性百分比 = $811 / (10 + 811) \times 100\% = 98.78\%$; HPV14 种高危型阴阳性检测总一致性百分比 = $(161 + 811) / (161 + 4 + 10 + 811) \times 100\% = 98.58\%$; 通过对上述 14 例样本测序, 其中有 11 例与 A 试剂结果相符, 有 3 例样本测序结果与 B 公司结果一致。应用 Kappa 评价方法对 A 试剂和 B 试剂检测结果进行诊断一致性分析, Kappa 值 = 0.950, P = 0.000。α = 0.05 检验水准下, B 试剂与 A 试剂检测结果的一致性有统计学意义, 阴阳性诊断一致性好。统计 HPV14 种高危型分型一致性数据, 两种试剂分型结果完全一致样本数为 145 例, 而两种试剂均检测为阳性的样本总数为 161 例, 两种试剂的 HPV14 种高危型分型一致性百分比为 90.06%。对该 16 例分型结果不相符的样本进行测序, 测序结果有 12 例与 A 公司检测一致, 有 4 例与 B 公司检测结果一致。

2.3 两种试剂检测宫颈鳞癌和宫颈腺癌检测 A 试剂和 B 试剂检测宫颈癌组织样本, 检测阳性率以及各型别所占比例见表 3。

表 3 A 试剂和 B 试剂检测宫颈癌病例中 HPV 结果及型别分析(%)

宫颈癌种类	阳性	16 型	18 型	31 型	33 型	35 型	39 型	45 型	51 型	52 型	53 型	56 型	58 型	59 型	66 型	68 型	82 型
鳞癌-A 试剂	100.00	66.7	10.4	6.3	4.2	/	/	/	/	8.3	4.2	/	14.6	/	2.1	4.2	/
鳞癌-B 试剂	95.83	64.6	10.4	6.3	4.2	/	/	/	/	6.3	/	/	12.5	/	2.1	4.2	/
腺癌-A 试剂	83.33	50.0	27.7	/	/	/	/	5.5	11.1	/	/	/	/	/	/	5.5	/
腺癌-B 试剂	77.78	44.4	22.2	/	/	/	/	5.5	11.1	/	/	/	/	/	/	5.5	/

通过两种试剂对 48 例宫颈鳞癌样本进行检测, A 试剂阳性率为 100%, B 试剂阳性率为 95.83%, 其中 16 型、58 型、18 型在各型别中所占比例较高, 其中 58 型与 16 型混合感染较多, 存在 2 例 53 型与其他型混合感染, 而未检测到 82 型。另外, 对 18 例宫颈腺癌样本进行检测, A 试剂检测阳性率为 83.33%, B 试剂为 77.78%, 其中 16 型、18 型和 51 型在腺癌样本中所占比例较高。

2.4 两种方法检测试剂检测宫颈癌样本结果分析 采用两种试剂对宫颈鳞癌和腺癌检测, A 试剂的宫颈鳞癌和宫颈腺癌阳性检出率比 B 试剂高。在宫颈鳞癌样本中, A 试剂 HPV 核酸均检测为阳性, B 试剂存在少量 HPV 阴性情况。而在宫颈腺癌中 HPV 检测阴性率

相对较高。在宫颈鳞癌中排名前三位的型别分别为 16 型、58 型、18 型。在宫颈腺癌中排名前三位的型别分别为 16 型、18 型、51 型, 说明各型别在不同病理诊断结果样本中所占比例有所不同。

3 讨论

目前国内临床上主要采用煮沸法、磁珠法等对 HPV 核酸进行提取^[7], 上述方法需要高速离心, 去废液, 多次开关盖管等操作, 样本处理耗时长, 其中煮沸法还需经过煮沸裂解, DNA 存在损耗, 同时还容易造成气溶胶污染。在本研究中, A 试剂采用的免核酸提取法(一步法)与 B 试剂煮沸法相比, 每个病例只需取少量宫颈细胞样本且处理时间短, 无需加热、离心、去废

液等操作,大大减少污染环节。因此,A试剂具有快速、简便、高灵敏、高通量、易开展、低成本、全程质控等特点,更加适用于国宫颈癌筛查的普及,并且大幅提升筛查质量。

A试剂和B试剂HPV检测阳性率分别为18.5%和16.5%。其中,HPV16型、52型、58型、56型、51型、68型和53型在各型别中所占比例较高,有些型别A试剂检出比例比B试剂高,可能是A试剂的最低检测限为400 copies/ml,灵敏度比B试剂高,在检测性能上稍优于B试剂。

两种试剂检测14种高危型阳性一致性百分比为97.57%,阴性一致性百分比为98.78%,总一致性百分比为98.58%,两种试剂的一致性较好。B试剂检出2例82型,A试剂检测出12例为53型单型感染,8例53型混合感染,与测序结果一致,说明HPV53型比HPV82型比例更高。凌王芳等^[8]对2338例进行检测,HPV53型占比也较高,排列第5。岑尧等^[9]对中国女性人乳头瘤病毒感染状况以及高危型别分布研究分析,统计了我国南北方总的HPV53型769例占5.1%,而HPV82仅检出5例占0.032%,HPV53型感染率明显比HPV82型高,虽HPV53型和HPV82均被列为中等风险型,但A试剂HPV15种型别中检测HPV53型相对于B试剂检测HPV82型更加适合人群宫颈病变的早期筛查,为提示宫颈病变的风险、防止筛查中的漏检情况起到重要的意义。

通过两种试剂检测宫颈鳞癌比较,B试剂在宫颈鳞癌检测中存在漏检情况,可能是B试剂检测的灵敏度稍低于A试剂,另外,也可能是两种试剂检出区域不同,在HPV整合过程中,许多基因如E2、L1被破坏或缺失^[10],这将使得待测HPV DNA的有效浓度降低,从而导致假阴性。许多研究发现宫颈鳞癌存在HPV阴性情况,虽然高危型人乳头瘤病毒是已被证实的引起宫颈病变的主要原因,但并不是唯一因素,宫颈病变的发生及发展是多因素共同作用的结果,如其他病原体感染,单纯疱疹病毒Ⅱ型、EB病毒以及支原体感染造成^[11],也受多产次、吸烟、分娩年龄较早及免疫功能缺陷等其他环境因素影响^[12],其次临床上虽已有多种方法对HPV DNA进行分型检测,但也不排除仍存在我们尚未发现高危型HPV,任何一种HPV检测方法都存在一定假阴性率,这与检测目的基因片段、检测方法及其灵敏度有关^[13],还有就是部分患者的病毒感染形成病变,在恢复过程中病毒可通过自身免疫机制得到清除,但此时宫颈病灶已经形成,就会造成临床上HPV检测结果呈阴性,而宫颈病变持续存在。

研究显示,在宫颈腺癌中HPV的阴性率高于宫颈鳞癌,可能与腺细胞难于取材有关,也可能是由于腺癌包括不常见的腺癌亚型^[14],例如透明细胞腺癌、中肾腺癌、子宫内膜样腺癌和宫颈微腺癌等,均可能与高危型HPV感染无关,这类宫颈癌蜡块组织中HPV检测阳性率仅为0%~27.3%^[15]。

通过此次临床研究表明:两种荧光定量PCR HPV分型检测试剂的检测结果具有很好的一致性,但A试剂在宫颈癌样本的检测中HPV检出率更高,型别设置更加合理,并且操作简单,更适用于人群宫颈病变的早期检测与筛查具有较高的临床应用价值。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 李洪安, 蒋金芳, 李锋. HPV核酸原位杂交技术的应用体会 [J]. *农垦医学*, 2006, 28(4): 244-245.
- [3] Chen WG, Yang CM, Xu LH, et al. Gene chip technology used in the detection of HPV infection in esophageal cancer of Kazakh Chinese in Xinjiang Province [J]. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*, 2014, 34(3): 343-347.
- [4] 吴颖, 曹芬芳, 刘太林, 等. 湖南地区7076例女性HPV感染情况及分型分析 [J]. *实用预防医学*, 2019, 26(4): 474-477.
- [5] 王景芬. 实时荧光定量PCR在HPV检测中的应用研究 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2018(22): 187, 189.
- [6] 高鑫, 朱武洋, 卢学新. 实时荧光定量PCR在病毒检测中的应用 [J]. *中国人兽共患病学报*, 2018, 34(7): 660-667.
- [7] 许琼, 李文静, 田芯瑗, 等. 磁珠法和煮沸法核酸提取在HPV-DNA分型中的比较 [J]. *检验医学与临床*, 2018, 15(6): 764-767.
- [8] 凌王芳, 王璐璐, 蒋玲玲, 等. 人乳头瘤病毒感染与宫颈病变的关系研究 [J]. *实用预防医学*, 2016, 23(4): 464-466.
- [9] 岑尧, 张翠英, 张雅丽, 等. 中国女性人乳头瘤病毒感染状况及高危型别分布的Meta分析 [J]. *癌症进展*, 2013, 11(1): 75-81.
- [10] 梁银, 张守桃. 高危型HPV DNA整合致宫颈鳞癌的机制及检测进展 [J]. *实用妇科内分泌电子杂志*, 2018, 5(6): 4-5.
- [11] Del Pino M, Rodriguez-Carunchio L, Ordi J. Pathways of vulvar intra-epithelial neoplasia and squamous cell carcinoma [J]. *Histopathology*, 2013, 62(1): 161-175.
- [12] Bruni L, Diaz M, Castellsagué X, et al. Cervical human papillomavirus prevalence in 5 continents: meta-analysis of 1 million women with normal cytological findings [J]. *J Infect Dis*, 2010, 202(12): 1789-1799.
- [13] 隋龙, 丛青. 人乳头瘤病毒检测临床应用误区 [J]. *中国实用妇科与产科杂志*, 2016, 32(5): 395-398.
- [14] 王瑶. 非HPV感染相关宫颈腺癌的研究进展 [J]. *国际妇产科学杂志*, 2018, 45(1): 60-65.
- [15] Pirog EC, Lloveras B, Molijn A, et al. HPV prevalence and genotypes in different histological subtypes of cervical adenocarcinoma, a worldwide analysis of 760 cases [J]. *Mod Pathol*, 2014, 27(12): 1559-1567.