

门诊病人人类乳头瘤病毒分型在宫颈病变筛查中的应用

叶芳¹, 秦伟², 张坦如³, 黄雄文¹, 戴海明⁴, 王宏志¹

作者单位:¹中国科学院合肥肿瘤医院医学病理部, 安徽 合肥 230031;²中国科学技术大学附属第一医院(安徽省立医院)科教科, 安徽 合肥 230038;³安徽中医药大学第二附属医院口腔科, 安徽 合肥 230061;⁴中国科学院合肥物质科学研究院分子病理研究室, 安徽 合肥 230031

通信作者: 王宏志, 博士生导师, 副主任医师, 研究方向为生物物理学研究, E-mail: wanghz@hfcas.ac.cn

基金项目: 国家自然科学基金(21772201)

摘要: **目的** 分析医院门诊就诊病人人类乳头瘤病毒(HPV)高危、中危及低危基因型分布状况, 并探究高危型人类乳头瘤病毒(HR-HPV)检测在宫颈病变筛查中的作用。 **方法** 选取2017年3月至2018年4月在中国科学院合肥肿瘤医院就诊的妇科门诊病人1 814例, 分别采用反向点杂交法技术检测及HPV分型检测, 分析高危、中危及低危共28种基因型分布状况。另外选择同期进行HR-HPV检测、宫颈薄层液基细胞学检查(TCT)和阴道镜及病理组织学检查病人210例, 以病理组织学结果为参考标准, 研究HR-HPV、TCT以及两者联合检测用于宫颈病变筛查效能。 **结果** 1 814例门诊病人共176例HPV检测阳性, 阳性率为9.70%, 其中高危型或高危型混合中、低危型阳性率为6.94%(126/1814); 中、低危型及混合感染阳性率2.76%(50/1814)。基因型排名前10位分别是HPV-16、58、52、53、66、56、18、31、33、42, 其中HPV-53、66和42是中低危型。HR-HPV联合TCT诊断宫颈病变的灵敏度为97.01%(65/67), 阴性预测值为96.78%(60/62), 漏诊率为2.99%。HR-HPV联合TCT检测分别与HR-HPV、TCT比较, 均差异有统计学意义($\chi^2=5.220, 5.372, P<0.05$)。 **结论** 合肥地区HPV基因亚型分布不同其他地区, 有待于进一步确认。HR-HPV联合TCT检测优于单项检查, 对早期发现宫颈病变的具有重要筛选意义, 值得在妇科门诊广泛应用推广。

关键词: α 乳头状瘤病毒属; 宫颈肿瘤; 宫颈非典型增生; DNA探针; HPV; 阴道镜检查; 薄层液基细胞学

Application of HPV typing and high-risk types in cervical lesions screening in outpatients

YE Fang¹, QIN Wei², ZHANG Tanru³, HUANG Xiongwen¹, DAI Haiming⁴, WANG Hongzhi¹

Author Affiliations: ¹Department of Medical Pathology, Hefei Cancer Hospital, Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China; ²Department of Science and Education, The First Affiliated Hospital of The University of Science and Technology of China (Anhui Provincial Hospital), Hefei, Anhui 230038, China; ³Department of Stomatology, The Second Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine, Hefei, Anhui 230061, China; ⁴Molecular Pathology Laboratory, Hefei Research Institute of Chinese Academy of Sciences, Hefei, Anhui 230031, China

Abstract: Objective To analyze the distribution of high-risk, medium-risk and low-risk human papillomavirus (HPV) genotypes in outpatients of hospital, and to explore the role of high-risk human papillomavirus (HR-HPV) detection in cervical lesions screening. **Methods** A total of 1814 gynecological outpatients who were admitted to the Hefei Cancer Hospital of the Chinese Academy of Sciences from March 2017 to April 2018 were selected. The reverse dot hybridization method and HPV typing test were used to analyze the distribution of 28 genotypes with high-risk, medium-risk and low-risk. In addition, 210 patients were selected for HR-HPV detection, cervical thin layer liquid-based cytology (TCT), colposcopy and histopathological examination. The histopathological results were used as the reference standard to study the efficacy of HR-HPV, TCT, and HR-HPV combined with TCT in screening for cervical lesions. **Results** A total of 176 patients with 1814 outpatients had positive HPV test, with a positive rate of 9.70%. The positive rate of high risk type or mixed medium and low risk type was 6.94% (126/1814). The positive rate of medium-risk, low-risk, and mixed infections was 2.76% (50/1814). The top 10 genotypes were HPV-16, 58, 52, 53, 66, 56, 18, 31, 33 and 42, among which HPV-53, 66 and 42 were medium-risk and low-risk types. The sensitivity of HR-HPV combined with TCT in the diagnosis of cervical lesions was 97.01% (65/67), the negative predictive value was 96.78% (60/62), and the rate of missed diagnosis was 2.99%. HR-HPV combined with TCT was compared with HR-HPV and TCT, respectively. The differences were statistically significant ($\chi^2=5.220, 5.372$, respectively, $P<0.05$). **Conclusion** The distribution of HPV genotypes in Hefei is different from other re-

gions, and further confirmation is needed. HR-HPV combined with TCT detection is better than single examination, which has important screening significance for the early detection of cervical lesions, and can be widely used in gynecological outpatient department.

key words: Alpha papillomavirus; Uterine cervical neoplasms; Uterine cervical dysplasia; DNA probes, HPV; Colposcopy; Liquid-based cytology test

美国癌症学会公布 2018 年全球癌症统计数据 displays, 新增宫颈癌病人近 57 万人, 死亡 31 万多人, 发病率处于全球癌症总排名第十位, 位于妇科肿瘤第二位, 仅次于乳腺癌。妇女生殖道 HPV 感染是一种常见的性传播疾病。性活跃妇女可能有 50% 感染过至少一种型别的 HPV。由于人乳头瘤病毒感染是宫颈癌的主要病因, 因此必须重视这种感染, 重视 HPV 的检查, 及时发现, 及时进行治疗^[1]。近些年来有关人类乳头瘤病毒(HPV)的研究广受关注, HPV 是一种结构简单的 DNA 病毒, 只有蛋白衣壳和核心构成, 根据编码主要衣壳蛋白的基因序列不同, 目前可分为 200 余种基因亚型, 根据其肿瘤发生的危险度可分为高危型、中危型和低危型, 其中高危型主要引起宫颈上皮内瘤变和宫颈浸润癌; 中低危型仅少部分引起生殖器湿疣等良性病变^[2]。为了了解本地就诊门诊病人中人类乳头瘤病毒常见高危、中危和低危基因亚型存在和分布状况, 特回顾性收集历史检测数据统计分析, 并探讨高危型 HPV(HR-HPV)在宫颈病变筛查中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2017 年 3 月至 2018 年 4 月在中国科学院合肥肿瘤医院就诊 1 814 例妇科门诊病人, 年龄范围为 20~78 岁, 年龄(39.3±12.2)岁, 入选病例为有性生活史, 阴道表面有表浅的炎症以及接触性出血; 常伴有白带增多、腥臭, 阴道不规则出血, 骶尾、臀部及大腿部的持续性疼痛等。其中有 210 例临床疑似宫颈病变的病人同时行 HPV 分型、TCT 及阴道镜及病理组织学检查。病人或其近亲属知情同意, 本研究符合《世界医学协会赫尔辛基宣言》相关要求。

1.2 试剂与仪器 基因扩增仪为杭州安杰恩医学科技有限公司生产, HPV 核酸检测及分型试剂盒由广州和实生物技术有限公司生产, 宫颈薄层液基细胞学检查(TCT)专用采集管为广州市达诚医疗技术有限公司生产提供。

1.3 方法

1.3.1 HPV 基因亚型检测 使用专用取样刷在宫颈管内顺时针方向旋转 4~5 圈, 并将宫颈管分泌物置入专用保存液中送检。检验部门按照试剂盒说明书进行检测, 将试剂盒滴入事先调好的裂解液中

混合、反应、冲洗。通过基因捕获技术(HC-2)进行 13 种高危型(分别为 HPV-16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68)、5 种中危型(HPV-26、53、66、73、82)、10 种低危型(HPV-6、11、40、42、43、44、54、61、81、83)共 28 基因亚型检测。

1.3.2 液基细胞学检测 收集宫颈管及宫颈外口脱落的细胞直接置入装有液基保存液的专用小瓶内, 95% 乙醇固定, 巴氏染色, 由同一病理医师阅片诊断。使用 TBS 分类标准进行检测分类^[3], 分别是: ①无上皮内病变或恶性病变(NLIM); ②意义不明的非典型鳞状细胞(ASCUS); ③不除外上皮内高度病变的不典型鳞状细胞(ASC-H); ④低度的鳞状上皮内病变(LSIL); ⑤高度的鳞状上皮内病变(HSIL)。细胞学以出现 ASC-H 以上病变为阳性。

1.3.3 阴道镜及病理组织学检查 常规应用醋酸白试验和碘试验, 于可疑病变部位活检, 对无异常阴道镜图像者在宫颈转化区 3、6、9、12 点处取活检及宫颈管搔刮取标本行病理组织学检查。结果判断以宫颈上皮内瘤变(CIN) I 级、II 级、III 级和宫颈癌(SCC)为阳性病变。

1.4 观察指标 以病理组织学结果为参考标准, 分别评价 HR-HPV、TCT 以及两者联合检测在宫颈病变筛查中灵敏度、特异度、阳性预测值、阴性预测值、漏诊率、误诊率。

1.5 统计学方法 本次研究所得数据使用 SPSS 19.0 统计软件, 计量资料、计数资料的组间比较分别采用 *t* 检验及 χ^2 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 门诊病人 1 814 例 HPV 分型检测结果分析 1 814 例门诊病人共 176 例 HPV 检测阳性, 阳性率为 9.70%, 其中高危型或高危型混合高、中、低危型为 126 例, 阳性率为 6.94%; 中、低危型及混合感染为 50 例, 阳性率 2.76%。126 例高危型及混合感染者为年龄(41.7±12.6)岁, 与 50 例中、低危型及混合感染者年龄(39.3±11.7)岁比较, 差异无统计学意义($t = 1.185, P > 0.05$)。

176 例感染者中单一型感染者 152 例, 其中单一高危型 104 例, 中危型 26 例, 低危型 22 例; 多型混合感染 24 例, 其中两型感染为 20 例, 三型感染为 2 例,

四型感染为2例;混合感染者中以高危型混合中、低危型为主,为22例;中、低危型混合者为2例。176例HPV阳性病人中共检出24种基因型,其构成比排名前10位分别是HPV-16、58、52、53、66、56、18、31、33、42,其中只有53、66和42是中低危型,余下7种亚型均是高危型,另外HPV-26、73、43、81共四种中、低危型均未检出。结果见表1。

表1 176例人类乳头瘤病毒阳性病人中24种HPV基因型分布

基因型	例数/例	构成比/%	阳性率/%	基因型	例数/例	构成比/%	阳性率/%
高危型				中危型			
HPV-16	47	26.70	2.59	HPV-53	17	9.66	0.94
HPV-18	8	4.54	0.44	HPV-66	14	7.95	0.77
HPV-31	8	4.54	0.44	HPV-82	1	0.57	0.06
HPV-33	7	3.98	0.38	低危型			
HPV-35	2	1.14	0.11	HPV-6	3	1.70	0.16
HPV-39	4	2.27	0.22	HPV-11	3	1.70	0.16
HPV-45	5	2.84	0.28	HPV-40	2	1.14	0.11
HPV-51	4	2.27	0.22	HPV-42	7	3.98	0.38
HPV-52	17	9.66	0.94	HPV-44	6	3.41	0.33
HPV-56	11	6.26	0.61	HPV-54	6	3.41	0.33
HPV-58	21	11.93	1.16	HPV-61	2	1.14	0.22
HPV-59	3	1.70	0.16	HPV-83	2	1.14	0.11
HPV-68	6	3.41	0.33				

2.2 HR-HPV、TCT以及两者联合检测在宫颈病变筛查中的比较 以病理组织学结果为金标准,以HR-HPV中任何一型阳性即判为HR-HPV阳性,TCT出现ASCH以上病变即判为阳性。HR-HPV诊断宫颈病变的灵敏度为74.63%(50/67),特异度为76.22%(109/143),阳性预测值为59.52%(50/84),阴性预测值为86.51%(109/126),误诊率为23.78%,漏诊率为25.37%;TCT诊断宫颈病变的灵敏度为71.64%(48/67),特异度为77.62%(111/143),阳性预测值为60.00%(48/80),阴性预测值为85.38%(111/130),误诊率为22.38%,漏诊率为28.36%;HR-HPV联合TCT,以其中一项试验阳性即判为阳性,诊断宫颈病变的灵敏度为97.01%(65/67),特异度为41.96%(60/143),阳性预测值为43.92%(65/148),阴性预测值为96.78%(60/62),误诊率为58.04%,漏诊率为2.99%。结果见表2。

经 χ^2 检验,HR-HPV联合TCT检测分别与HR-HPV、TCT比较,分别为 $\chi^2=5.220$ 、 5.372 , $P=0.029$ 、 0.026 ,均差异有统计学意义($P<0.05$);HR-HPV与TCT比较,差异无统计学意义($\chi^2=0.004$, $P>0.05$)。

表2 HR-HPV、TCT以及两者联合检测在宫颈病变筛查中的比较/例

检测方法	病理组织学		合计
	阳性	阴性	
HR-HPV			
阳性	50	34	84
阴性	17	109	126
TCT			
阳性	48	32	80
阴性	19	111	130
HR-HPV+TCT			
阳性	65	83	148
阴性	2	60	62

3 讨论

HPV具有嗜上皮性,在人和动物中分布广泛,种间不存在交叉感染。HPV感染是一种性传播疾病,绝大多数是感染是一过性或间歇性的,通常在4~6个月内超过90%的HPV感染者由人体自身免疫系统介导被自行清除消退或受到抑制,只有5%~10%可成为持续性感染^[4],而持续性高危型感染会导致宫颈上皮内瘤变和宫颈癌发生。HPV检查则主要检测人是否携带有HPV病毒,可通过染色镜检法、HPV的DNA检测法或血清学试验来检查是否感染了HPV^[4]。本次门诊调查总HPV阳性率为9.70%(176/1814),其中高危型阳性率仅为6.94%(126/1814),中低危型为2.76%(50/1814),明显低于国内同类调查^[2,5-8]。可能是由于我院所处的合肥市为安徽省省会城市,医疗资源相对丰富,三甲综合性医院较多,导致病情较重者直接去三甲医院,而于我院就诊的妇科门诊病人病情较轻,处于疾病筛查初始端的缘故。关于基因型亚型分布,中国上海某次调查型别前五位是HR-HPV 52、16、53、58和51^[5],广州HR-HPV前五位是52、16、58、39、18^[2],北京HR-HPV前五位是16、18、52、51和58^[6],石家庄HPV前五位是16、6、58、52和18^[7],湖北地区前五位是16、52、58、53和18^[8]。本次门诊调查我院前十位是HPV-16、58、52、53、66、56、18、31、33、42,其中高危型前五位是16、58、52、56、18,另外中、低危型HPV53、66和42分别位居第4、5和10。但本次调查例数不多,也只统计了一家肿瘤专科医院,目前也不能确定合肥地区HPV感染率是否就低于其他地区,有待于今后收集合肥市多家医院参数,方可得出准确定论。

近些年来,女性的宫颈癌的发病率逐渐增高,大部分在发现时,已经是疾病的晚期了,错过了最

佳的治疗时机,从而延误治疗^[9-11]。宫颈癌对病人的生命安全影响极大,治愈率极低,对病人的生活质量的影响较大^[12]。在临床生活中,必要对各个宫颈样本中存在的HPV进行分型检测,从而有助于更详细的分析各种HPV的致病性,以达到最佳的临床疗效。这是保障病人子宫健康的基本预防措施,对已有临床症状的病人,适合病人自身的疾病的变化^[13]。宫颈癌的发生发展是个渐进的过程,从宫颈上皮内瘤变发展至宫颈癌通常为8~10年^[14-15],因此早期积极有效的筛查和预防性措施显得非常重要。宫颈癌及癌前病变的病理学筛查方式有宫颈刮片、薄层液基细胞学、阴道镜及病理组织学活检,我国多数地方采用TCT作为宫颈癌及癌前病变筛查的主要手段^[16],但TCT受临床标本采集时血液黏液过多,有效细胞少或为坏死组织,病理技术中包埋、切片、染色及病理医生对病变程度的判断经验均可影响病理诊断结果,因此有一定的盲目性和假阴性,其方法学局限性使其敏感度达不到更好的筛查和诊治目标^[17]。阴道镜及病理组织学由于资源有限,操作繁杂,很难大范围用于宫颈病变的筛查。

TCT和阴道镜及活检是细胞和组织学检查,而HR-HPV是宫颈癌及宫颈上皮内瘤变的病原学检测^[18]。本研究通过对210例同期进行三项检测病人结果分析认为,HR-HPV联合TCT检测灵敏度达到97.01%高于HR-HPV(74.63%)和TCT(71.64%),联合检测的阴性预测值达到96.78%高于HR-HPV(86.51%)和TCT(85.38%),联合检测的漏诊率为2.99%远低于HR-HPV(25.37%)和TCT(28.36%),均差异有统计学意义($P < 0.05$)。因此联合检测HR-HPV和TCT是分别从宫颈癌及癌前病变的病原学和细胞学两个方面进行筛查,具有重要的临床意义。有作者^[3]认为HR-HPV、TCT均阴性者,未来3~5年内发生宫颈上皮内瘤变的风险几乎为0。因此建议如果两者均阴性,可间隔3~5年再复查一次即可达到随访目标。

综上所述,本次所调查门诊病人HPV感染率和基因型分布有别于其他地区,可能由于病人例数较少,有待于下一步增大病例数和扩大调查范围以确认结果。另外HR-HPV联合TCT检测用于门诊病人宫颈病变的筛查具有重要意义,二者之一阳性者行阴道镜及病理组织学活检确认,两者均阴性者可以间隔3年随访。

参考文献

[1] BLATT AJ, KENNEDY R, LUFF R, et al. Comparison of cervical

cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices[J]. Cancer Cytopathology, 2016, 124(5):362-363.

[2] 蔡振华,方伟祯,肖木洲,等. HPV分型及其高危亚型与宫颈病变的关系[J]. 中国微生态学杂志, 2016, 28(9):1097-1099.

[3] 刘敏,余倩. HPV联合TCT检测在宫颈疾病筛查中的应用[J]. 检验医学与临床, 2017, 14(1):92-94.

[4] MESHER D, PANWAR K, THOMAS SL, et al. The impact of the national hpv vaccination program in england using the bivalent hpv vaccine: surveillance of type-specific hpv in young females, 2010-2016[J]. J Infect Dis. 2018, 218(6):911-921.

[5] 夏艳,金志军,倪云翔,等. 上海市人乳头瘤病毒感染及病毒分型与宫颈病变的探讨[J]. 第二军医大学学报, 2017, 38(12):1526-1531.

[6] 沈洁,高丽丽,张月,等. 北京市宫颈癌筛查妇女中高危型HPV感染状况及在宫颈癌前病变中的分布[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(5):493-496.

[7] 王晓娜. HPV基因型分布及液基细胞学联合HPV分型检测和HPV16DNA整合状态在宫颈病变筛查和诊治中的应用价值[D]. 石家庄:河北医科大学, 2013:18.

[8] 徐万洲,吴青,李艳,等. 湖北地区女性人乳头病毒基因分型检测的临床意义[J]. 安徽医药, 2017, 21(6):1030-1033.

[9] KREVOLIN M D, HARDY D, PANE J, et al. Development and validation of a preanalytic procedure for performing the cobas HPV test in Sure Path preservation fluid[J]. J Mol Diagn, 2017, 19(2):288-294.

[10] 李雷,孙爱军. 高危亚型人乳头瘤病毒感染及宫颈病变对妊娠的影响[J]. 中华围产医学杂志, 2016, 19(10):795-800.

[11] 陈国斌,王颖,刘植华,等. 阴道乳酸杆菌与宫颈HPV感染及子宫颈癌前病变的相关性研究[J]. 中国现代药物应用, 2016, 10(12):3-5.

[12] 沈伶,许丽璇,李小平,等. 粤东地区妇女人乳头瘤病毒感染情况和亚型分布及其与宫颈癌的关系[J]. 癌变·畸变·突变, 2017, 29(3):226-229.

[13] 张园,冯阳春,黄艳春,等. 新疆维吾尔族宫颈癌患者人乳头瘤病毒感染与外周血中Th17细胞水平的相关性研究[J]. 东南大学学报(医学版), 2016, 35(5):699-703.

[14] 王雪卿,孙丽芳,梁向华,等. 高危型人乳头状病毒的感染状态及分型与宫颈病变发生的相关性研究[J]. 生殖医学杂志, 2014, 23(8):633-638.

[15] 刘渝,郑秀慧,王婉,等. 宫颈癌及宫颈上皮内瘤变患者术后复发与高危型人乳头瘤病毒载量和持续阳性的相关性研究[J]. 安徽医药, 2018, 22(11):2102-2105.

[16] KREVOLIN MD, HARDY D, PANE J, et al. Development and validation of a preanalytic procedure for performing the cobas HPV test in SurePath preservative fluid [J]. J Mol Diagn, 2017, 19(2):288-294.

[17] CURRY SJ, KRIST AH, OWENS DK, et al. Screening for cervical cancer: US preventive services task force recommendation statement[J]. JAMA. 2018, 320(7):674-686.

[18] BLATT AJ, KENNEDY R, LUFF R, et al. Comparison of cervical cancer screening results among 256,648 women in multiple clinical practices[J]. Cancer Cytopathol, 2016, 124(5):362-363.

(收稿日期:2018-11-13,修回日期:2019-02-28)